



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

동종조혈모세포이식 환자에서
GSTA1 유전적 다형성에 따른
busulfan의 집단약동학

**A population pharmacokinetic analysis of busulfan with
GSTA1 polymorphisms in patients undergoing
allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

2018 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 예방·임상·사회약학전공

최 보 윤

동종조혈모세포이식 환자에서 *GSTA1* 유전적 다형성에 따른 busulfan의 집단약동학 평가

지도교수 오 정 미

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함
2018 년 6 월

서울대학교 대학원
약학과 예방·임상·사회약학전공
최 보 윤

최보윤의 박사학위논문을 인준함
2018 년 6 월

위 원 장 김 은 경

부 위 원 장 윤 성 수

위 원 이 장 익

위 원 김 경 임

위 원 오 정 미



국문초록

Busulfan은 악성 및 비악성 혈액 질환의 치료를 위한 동종조혈모세포이식(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloHSCT)에서 가장 널리 사용되는 전처치 약물이다. Busulfan은 치료역이 매우 좁아 그 노출(exposure)량이 이상반응의 발생률 및 치료실패율과 연관성을 가짐이 기존 연구를 통하여 보고되어 있다. 이에 950-1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 의 AUC(area under the concentration-time curve)를 표적으로 한 치료적 약물 농도 모니터링(therapeutic drug monitoring, TDM)을 시행할 것이 권장되고 있다. 그러나 busulfan은 약동학적으로 개인 간 변동(inter-individual variability, IIV) 및 개인 내 변동(intra-individual variability)이 큰 약으로, 그 노출량을 조절하는 데에 어려움이 있다.

상기 약동학적 변동은 busulfan 대사 효소인 GST(glutathione S-transferase)의 유전적 다형성(genetic polymorphisms)으로 일부 설명이 가능하다. GST superfamily에 속하는 일련의 동종 효소(isozyme), 즉 GSTA1, GSTM1, GSTP1 및 GSTT1은 모두 다형성이 높은 유전자에 코딩되어 있고, *GSTA1* *B(*A [-631T, -567T, -69C, -52G]/*B [-631G, -567G, -69T, -52A]), *GSTM1*과 *GSTT1*의 결손(deletion), *GSTP1* 313A>G의 변이는 해당 효소의 발현 감소 또는 결핍을 유발한다. 이러한 유전적 다형성이 busulfan의 약동학과 임상 성과에 미치는 영향에 대하여 몇몇 연구가 수행된 바 있으나 그 결과가 서로 상이하다. 또한 GST의 유전적 다형성 외에 체중, 나이, 질환 상태, 간기능, 약물상호작용 등도 busulfan의 약동학에

영향을 미친다고 보고된 바 있어 이들을 통합적으로 고려한 추가 연구가 필요한 상황이다.

NONMEM(nonlinear mixed-effects modeling)을 이용한 집단약동학(population pharmacokinetics) 분석은 이렇게 다양한 공변량이 약동학적 변동에 미치는 영향을 종합적으로 분석함으로써, 약동학을 수학적으로 설명하고 예측할 수 있는 매우 유용한 방법이다. NONMEM을 이용한 집단약동학 분석은 공변량과 같은 고정 효과(fixed effects) 외에도 개인 간 변동, 잔차 변동(residual variability)과 같은 임의 효과(random effects)를 함께 고려함으로써 산발적이고 적은 자료를 가지고도 약동학에 미치는 다양한 요인의 영향력을 더욱 강력하게 진단할 수 있게 한다.

이에 본 연구에서는 성인 alloHSCT 환자에서 busulfan의 약동학에 대한 집단약동학 모델을 구축하고 이를 통하여 GST 효소의 유전적 다형성이 busulfan의 약동학에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 더불어, GST 효소의 유전적 다형성과 busulfan의 약동학이 alloHSCT 환자의 임상 성과에 미치는 영향을 함께 분석하였다.

연구 대상 환자는 2009년부터 2011년까지 서울대학교병원에서 alloHSCT를 받은 성인 환자 중 이식 전처치로 busulfan을 정맥 투여 받은 자로 하였다. Busulfan은 1 회당 0.8 mg/kg의 용량으로 1 일 1 회 또는 1 일 4 회 2 시간에 걸쳐 정맥으로 주입하였다. Busulfan의 혈중 농도와 유전형을 분석하기 위한 혈액은 busulfan 주입 전, 첫 번째 용량 주입 후 2, 4, 6 시간째, 그리고 마지막 용량 주입 후 6 시간째에 중심 정맥으로부터 채취하였다. Busulfan의 혈장 농도는 HPLC/MS/MS(high-performance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다. 말초 혈액의 림프구에서 추출한 DNA로부터 *GSTA1* G-52A(haplotype *A/*B를 결정)를 직접염기서열법(direct sequencing)으로, *GSTP1* A313G를 SNaPshot으로, *GSTM1*과 *GSTT1*의 결손(deletion)을 PCR(polymerase chain reaction)로 분석하였다.

집단약동학 분석은 NONMEM®(version 7.2) 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 구조 모델(base model)은 1차 속도 소실의 one compartment open 모델을 사용하였다. 오차 모델(error model)의 경우, 잔차 오차(residual error)에는 combined additive-proportional model을, IIV에는 exponential model을 활용하였다. 공변량으로 busulfan의 청소율(clearance, CL)에 대하여 나이, 성별, 키, 체중, 체표면적, 혈청 creatinine, 사구체 여과율, 혈청 albumin, total bilirubin, 혈청 ALP(alkaline phosphatase), 혈청 AST(aspartate transaminase), 혈청 ALT(alanine transaminase), 약물상호작용, 그리고 *GSTA1*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1*의 유전 변이의 영향을 평가하였다. Stepwise procedure에 따라 약동학 모델의 목적 함수(minimum objective function, MOF) 값이 전진 선택법(forward selection)에서 3.84(P value < 0.05에 상응)를 초과한 감소 폭을 보이거나 후진 제거법(backward elimination)에서 3.84를 초과한 증가 폭을 보이는 경우 해당 공변량이 유의미한 것으로 평가하였다. 모델의 파라미터는 FOCE(first-order conditional estimation) 방법으로 추정하였다. 개발된 모델은 bootstrap과 시각적 예측 점검(visual predictive check, VPC)방법으로 검증하였다.

*GST*의 유전적 다형성과 busulfan AUC 및 임상 성과 간의 관계를

t-test, Chi square test와 Fisher exact test, linear by linear association test로 분석하였다. 전체 생존률(overall survival, OS) 및 무질환 생존률(disease-free survival, DFS)은 Kaplan-Meier method로 추정하고 그 군 간 차이를 log-rank test로 비교하였다. 임상 성과 분석 시 교란 요인을 보정하기 위한 다중회귀분석과 다변량 Cox 회귀분석을 시행하였다. 모든 통계 분석은 SPSS version 21.0을 이용하였고 P value < 0.05일 때 유의한 것으로 평가하였다.

결과적으로 총 36 명의 환자에서 101 건의 busulfan 혈중 농도 자료를 수집하였다. 모든 환자는 혈액 질환에 대하여 조직적합항원(human leukocyte antigen, HLA) 일치 공여자로부터 말초 혈액의 조혈모세포를 이식 받았다. *GSTA1*과 *GSTP1*의 유전형 빈도는 HWE(Hardy-Weinberg equilibrium)에 따르는 것을 확인하였다. Bootstrap과 VPC 시뮬레이션 결과는 본 최종 모델이 내적으로 타당함을 확인하였다. 기초 모델의 CL 추정치는 10.6 L/h, V 추정치는 41.7 L였다. CL는 *GSTA1* 유전형 및 체중과 유의한 상관성을 보였다. 최종 모델의 파라미터 추정 결과, 체중이 60 kg이며 *GSTA1* 유전형변이가 없는 전형적인 환자의 집단약동학 파라미터 추정치는 CL 11.0 L/h, V 42.4 L였다. CL 및 V의 IIV(변동 계수 %)는 각각 14.7%, 25.6%였다.

Busulfan의 CL는 체중이 10 kg 증가할 때 약 1.4배씩 증가하였고 *GSTA1* 유전형변이가 없는 환자에 비하여 있는 환자에서 15% 감소하였다(P value = 0.001). T-test 결과, busulfan의 AUC는 *GSTA1* wild-type 군에 비하여 변이 군에서 유의하게 높았다(1,031 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ vs. 1,232 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, P value = 0.001). AUC가 표적 범위를

초과한 환자 2 명 모두 *GSTA1* 변이를 가지고 있었다. 반면, AUC가 표적 범위에 미달된 환자 9 명 중 *GSTA1* 유전형이 결측인 1 명을 제외하고는 모두 *GSTA1* wild-type의 환자였다.

임상 성과 분석 결과, AUC가 표적에 비해 낮은 환자군에서는 급성 및 만성 GVHD와 치료관련사망(treatment related mortality, TRM)이 감소하고 생착 실패 또는 거부반응이 증가하는 경향이 있었다. 생존률 분석 결과, OS의 중간값은 35.2 개월, 추적관찰기간의 중간값은 47.6 개월이었다. 예후 인자 보정 시 OS는 표적 AUC에 도달한 군에 비해 이를 벗어난 군에서 감소하는 경향을 보였다(adjusted hazard ratio 3.642, P value = 0.061). 그러나 기존 연구에서 보고되었던 *GSTA1* 유전형이나 busulfan AUC에 따른 임상 성과 및 생존률의 유의한 차이는 본 연구에서 관찰되지 않았다.

본 연구는 *GSTA1*의 유전적 다형성이 성인 환자에서 busulfan의 약동학에 관여함을 규명한 첫 번째 집단약동학 연구로, *GSTA1*의 유전 변이가 있을 때에 busulfan의 CL가 15% 감소하며 AUC가 증가함을 확인하였다. 동 집단약동학 모델은 성인 alloHSCT 환자에서 *GSTA1*의 유전형에 따라 busulfan 노출량을 예측 및 조절하는 데에 활용할 수 있겠다.

주요어 : 부설판, glutathione S-transferase A1 (*GSTA1*), 유전적 다형성, 집단약동학, 동종조혈모세포이식

학 번 : 2008-21815

Table of Contents

Chapter 1. Introduction	1
1.1. 동종조혈모세포이식	1
1.2. Busulfan.....	9
1.3. Glutathione S-Transferase.....	26
1.4. 집단약동학	31
1.5. 연구의 목적	40
Chapter 2. Methods	41
2.1. 연구 대상자	41
2.2. 약물 투여.....	42
2.3. 혈액 채취.....	43
2.4. Busulfan 혈중 농도 분석	44
2.5. 유전형 분석	46
2.6. 집단약동학 분석.....	48
2.7. 임상 성과.....	50
2.8. 통계 분석.....	51

Chapter 3. Results	52
3.1. 환자 특성	52
3.2. 약동학 분석	57
3.3. 모델 검증	68
3.4. 임상 성과	71
Chapter 4. Discussion	73
Chapter 5. Conclusion	82
References	83
Abstract	94
Acknowledgement	100

Tables

Table 1. Disease stage definition according to the EBMT risk score	7
Table 2. Drugs interact with busulfan.....	24
Table 3. The primer sets and T _m used for the genotyping assays	47
Table 4. Patient characteristics.....	53
Table 5. Glutathione-S-transferase (<i>GST</i>) gene frequency	56
Table 6. Population pharmacokinetic model development process.	64
Table 7. Parameter estimates and 95% confidence intervals derived by bootstrapping	66
Table 8. Clinical outcomes according to busulfan exposures.....	72
Table 9. An example of nomogram for estimating clearance of busulfan	81

Figures

Figure 1. Pathophysiology of graft versus host disease.....	4
Figure 2. Chemical structure of busulfan.....	10
Figure 3. The metabolic pathway of busulfan	13
Figure 4. Difference between the total fixed dose and the total therapeutic drug monitoring dose of busulfan.....	18
Figure 5. Inter-individual variability in pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical outcomes of busulfan according to clinical and genetic factors	28
Figure 6. Random and fixed effects in population pharmacokinetic analysis using NONMEM®.....	36
Figure 7. Screening of covariate effects on clearance	59
Figure 8. <i>GSTA1</i> effects on CL and AUCs	67
Figure 9. Goodness of fit plot of the final population pharmacokinetic model	69
Figure 10. The visual predictive check (VPC) plot for the busulfan pharmacokinetic model evaluation	70
Figure 11. Environmentally determined genetic expression concept..	78

Chapter 1. Introduction

1.1. 동종조혈모세포이식

1.1.1. 동종조혈모세포이식의 개념

동종조혈모세포이식 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloHSCT)은 고위험성이나 재발성의 악성 및 비악성 혈액 질환에 대한 치료법이다. 이는 수혜자(recipient)의 조혈계와 면역계를 기증자(donor)의 건강한 조혈모세포로 대체하여 생착(engraftment)시키는 것을 이른다.¹ Thomas 등²이 1970년대에 alloHSCT 수혜자의 장기 생존을 처음으로 보고한 이래로 alloHSCT는 악성 혈액 질환의 효과적인 치료방법으로 널리 사용되기 시작하였고 점차 진화하였다. 그 과정에서 alloHSCT의 적응증과 적용가능 범위도 조금씩 변화하였다. 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML)의 경우 이전에는 alloHSCT가 주 치료 방법이었으나 현재에는 표적 치료가 그 자리를 상당 부분 대체하였다. 1990년대에는 저강도 전처치(reduced intensity conditioning, RIC) 요법이 도입되면서 고령 환자의 치료나 항암화학요법 및 자가조혈모세포이식 (autologous hematopoietic stem cell transplantation, autoHSCT)에 반응하지 않는 림프종 및 다발성골수종 환자의 구제 요법 등에도 alloHSCT를 적용할 수 있게 되었다.¹

1.1.2. 동종조혈모세포이식의 임상 성과

AlloH SCT는 악성 혈액 질환을 효과적으로 치료할 수 있으나 동시에 여러 합병증과 사망의 위험을 동반한다. 전처치 약물의 이상반응, 혈구감소증의 합병증, 이식편대숙주반응(graft versus host disease, GVHD), 면역 재구성(immune reconstitution)의 지연에 따른 감염 등으로 인하여 치료관련사망(treatment related mortality, TRM)이 발생할 수 있다. TRM의 발생 위험은 꾸준히 감소하고 있으나 성인 alloH SCT 환자에서 30% 이상으로 추정되어 여전히 극복해야 할 문제로 남아있다. 또한 많은 환자가 강도 높은 전처치 요법과 이식편대종양반응(graft versus malignancy, GVM)에도 불구하고 재발을 경험한다.¹

1.1.3. 동종조혈모세포이식의 임상 성과에 대한 영향 요인

상기 alloH SCT의 임상 성과는 다양한 요인의 영향을 받는다. 가장 중요한 요인 중 하나가 전처치 요법(conditioning regimen)이다. 전처치 요법은 수혜자에게 기증자의 조혈모세포를 주입하기 전에 항암제(및 면역 억제제)를 투여하는 것으로 첫째, 면역반응을 억제하여 기증자의 조혈모세포에 대한 거부반응(graft rejection)을 예방하고 둘째, 잔여 암세포를 파괴하는 것을 목적으로 한다. 따라서 전처치 요법의 효과가 부족할 경우 생존한 수혜자의 면역세포가 기증자의 조혈모세포를 제거하여 거부반응과 생착 실패(engraftment failure)의 위험이 높아지며, 잔존한 암세포에 의한 재발 가능성이 높아진다. 반대로

전처치 약물이 과량 투여될 경우 과도한 세포 독성과 면역 억제로 인하여 감염, 전처치 약물의 이상반응, GVHD 등의 합병증 발생이 증가하게 된다.¹ GVHD는 환자에게 주입된 기증자의 면역세포가 환자의 조직에 대한 면역 반응과 손상을 유발하는 반응인데, 이는 전처치 약물로 인하여 손상된 환자의 조직이 염증성 cytokine을 분비하여 항원제시세포 (antigen presenting cell, APC)를 활성화함으로써 시작된다(Figure 1).³ 그리하여 전처치 요법의 강도가 높을수록 GVHD의 발생률이 높아진다.^{4,5}

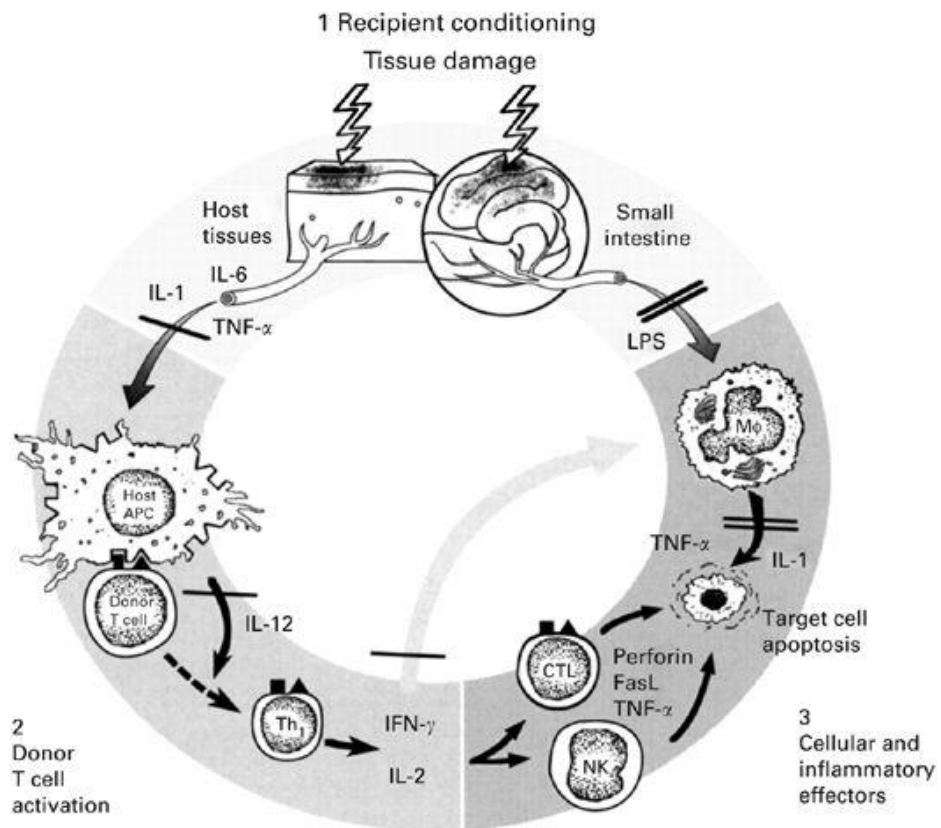


Figure 1. Pathophysiology of graft versus host disease

Adapted from Ferrara JLM and Reddy P. *Seminars in Hematology* (2006)

전처치 요법 외에 alloHSCT의 임상 성과에 영향을 미치는 또 다른 주요 요인은 기증자의 특성이다. 기증자와 수혜자의 조직적합항원(human leukocyte antigen, HLA)의 일치도가 높을수록 면역 관련 합병증인 거부반응과 GVHD의 발생 위험이 감소한다. 따라서 수혜자와 혈연 관계이며 HLA가 일치하는 기증자의 조혈모세포를 이식할 때 가장 좋은 임상 성과를 기대할 수 있다. 혈연관계 중 수혜자와 HLA가 완전히 일치하는 기증자가 없을 때에는 후보자 중 HLA 일치도가 가장 높은 자 또는 비혈연관계의 기증자로부터 조혈모세포를 채취할 수 있다. 기증자의 연령 또한 임상 성과에 영향을 미쳐, 기증자의 연령이 10 세 증가할 때마다 수혜자의 사망 위험비(hazard ratio)가 5.5%씩 증가하는 것으로 보고되어 있다.⁶

기증자의 조혈모세포는 기증자의 골수(bone marrow)에서 직접 채취하거나, 또는 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor, GCSF) 등을 투여함으로써 골수 내의 조혈모세포를 말초혈액으로 동원(mobilization)한 후 말초혈액에서 채취할 수 있다. 말초혈액에는 골수에 비하여 성숙한 면역세포들이 다량 존재하기 때문에 말초에서 채취한 조혈모세포를 이식하는 경우 일반적으로 생착은 빠른 반면 GVHD 발생 위험은 증가하는 것으로 알려져 있다.⁷

그 외에도 수혜자의 연령, 질환 상태, 진단일로부터 이식일까지의 기간, 기증자와 수혜자 간의 성별 불일치 등이 alloHSCT 환자의 임상 성과에 영향을 미칠 수 있다. EBMT(European Group for Blood and Marrow Transplantation) 및 ELN(European Leukemia Net) 소속 연구진들은 alloHSCT 이후의 위험도 예측 도구를 개발하기 위한 연구에서 수혜자의 나이가 많을 수록, 기저 질환이 진행할 수록,

진단일로부터 이식일까지의 기간이 12 개월을 초과할 수록, 기증자가 비혈연관계일 때, 그리고 기증자가 여성이고 수혜자가 남성일 때에 사망 위험이 증가한다는 연구 결과를 발표한 바 있다. 동 연구에서 기저 질환의 진행도는 그 진단과 치료에 대한 반응성에 따라 Table 1과 같이 분류하였다.⁸

Table 1. Disease stage definition according to the EBMT risk score

Diagnosis	Treatment status	Disease stage [†]
AML	CR1	Early
	CR2	Intermediate
	All other disease stages	Late
ALL	CR1	Early
	CR2	Intermediate
	All other disease stages	Late
CML	Chronic phase	Early
	All other stages than chronic phase or blast crisis	Intermediate
	Blast crisis	Late
MDS	Untreated or CR1	Early
	CR2 or PR	Intermediate
	All other disease stages	Late
NHL	Untreated or CR1	Early
	CR2, PR, or stable disease	Intermediate
	All other disease stages	Late

[†] Disease stage does not apply for patients with severe aplastic anemia (apply a same score with the early stage disease).

Abbreviations: AML = acute myeloid leukemia, ALL = acute lymphoid leukemia, CML = chronic myeloid leukemia, MDS = myelodysplastic syndrome, NHL = non-Hodgkin lymphoma, CR1 = first complete remission, CR2 = second complete remission, PR = partial remission

1.2. Busulfan

1.2.1. Busulfan의 일반 특성

Busulfan (1,4-bis(methanesulfoxy)butane, $C_6H_{14}O_6S_2$, 246.30 Da, Figure 2)은 알킬화제에 속하는 항암제로 세포 내 친핵체(nucleophile)를 알킬화하며 모든 세포 주기의 세포에 작용한다. Busulfan이 임상에 도입된 것은 경구용 정제(Myleran[®])가 FDA에서 CML의 유지 요법에 대한 사용 승인을 받은 1954년이다. 2002년에는 주사제(Busulfex[®])가 추가로 도입되었다. 현재에는 CML의 완화 요법과 alloHSCT에 대해서만 사용이 승인되어 있으며, 주로 alloHSCT을 위한 전처치 요법으로써 cyclophosphamide 또는 fludarabine과 병용된다.⁹ AlloHSCT을 위한 전처치 요법에서는 성인 환자와 체중이 12 kg을 초과하는 소아의 경우 0.8 mg/kg를, 체중 12 kg 이하의 소아에게는 1.1 mg/kg를 2 시간에 걸쳐 정맥으로 주입한다.¹⁰

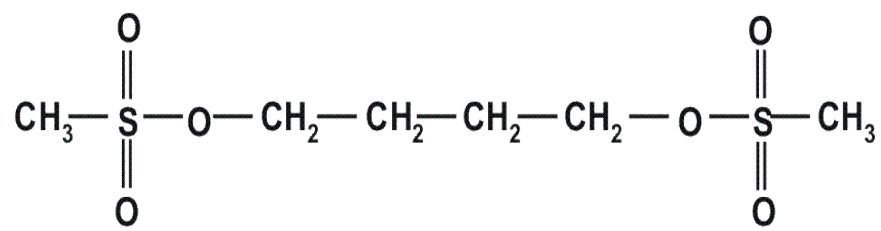


Figure 2. Chemical structure of busulfan

Busulfan의 약동학은 일반적으로 1 차속도 소실의 1 구획 모델로 잘 기술된다.¹¹ Busulfan 1 mg/kg를 경구로 단회 투약 시 최고 혈중 농도(C_{max})는 1,140.8 ng/mL, AUC(area under the concentration-time curve)는 5,461 ng · h/mL로 보고되어 있다. 소아 대상 연구에서 busulfan 0.8–1.2 mg/kg을 1 일 4 회 정맥으로 주입하며 치료적 약물 농도 모니터링(therapeutic drug monitoring, TDM)을 하였을 때 항정상상태에서의 최저 혈중 농도(C_{trough})는 25–1,244 µg/L로 보고된 바 있다.¹² Busulfan의 AUC를 산출할 때에는, 정맥 주입을 시작한지 6 시간째에 측정한 trough 농도 1 건으로도, 2–3 건의 혈중 농도에 기반한 경우와 유사한 신뢰도의 $AUC_{0-\infty}$ 를 산출할 수 있으며, 이는 6 건의 혈중 농도에 기반하여 산출한 $AUC_{0-\infty}$ 와 유의한 상관성을 가진다. Busulfan의 허가사항에서 제시한 혈중 농도 측정 시간은 초회 정맥 주입 시작 후 2, 4, 6 시간째이다. 경구제의 생체이용률(bioavailability, F)은 성인에서 0.47–1.03, 소아에서 0.22–1.2로 다양하게 보고되어 있으며 최고 혈중 농도 도달 시간(T_{max})는 1.5 시간이다. 단백결합률은 2.7–32.4%로 다양하게 보고된다. 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 농도는 혈장 농도와 유사하고 타액으로도 잘 분포된다. 분포 용적(volume of distribution, V)은 0.56–0.6 L/kg 이나 소아에서는 최대 1.42 L/kg까지 증가한다. 소실 반감기는 2.3–3.4 시간이다.¹⁰ Busulfan의 신장을 통한 소실은 제한적으로, 투여량 중 2%만이 미변화체의 형태로 신배설되며 신장 청소율(clearance, CL)은 2.4–5.4 mL/kg/h이다. 소변 중의 주요 대사체는 methane sulfonic acid이다.¹³ Busulfan의 소실은 대부분 간 대사를 통하여 이루어지며, 주요 대사체는 S-methanesulfonic acid, 3-hydroxytetrahydrothiophene-1, 1-

dioxide이다.¹⁴ Busulfan의 간대사 과정에는 GST(glutathione S-transferase), DPEP(dipeptidase), GGT(gamma-glutamyl transferase), CTH(cystathionine gamma-lyase) 등 많은 효소가 관여한다. FMO(flavin-containing monooxygenase)나 CYP450(cytochrome P450)의 관여 가능성도 제기되고 있으나 아직 관여 여부에 대한 명확한 결론이 나지는 않았다. 현재까지 busulfan의 대사에 확실히 관여한다고 알려진 효소 중 가장 큰 영향력을 미치는 것은 GST이다(Figure 3).¹⁵

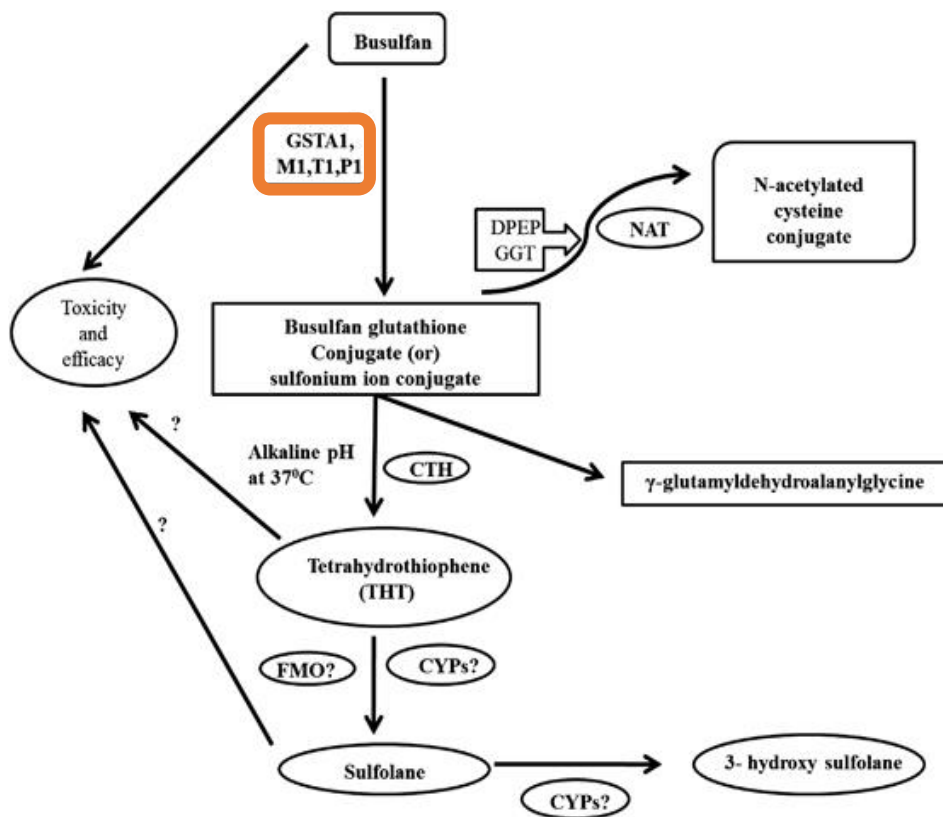


Figure 3. The metabolic pathway of busulfan

FMO = flavin-containing monooxygenase, CYPs = cytochrome P450 isoform enzymes, CTH = cystathionine gamma-lyase, DPEP = dipeptidase/cysteinylglycine, GGT = gamma-glutamyl transferase, NAT = N-acetyl transferase

Adapted from Uppugunduri CRS *et al. Pharmacogenomics J.* (2014)

Busulfan은 강한 세포독성을 통하여 골수 억제와 범혈구감소증을 유발할 수 있다. 또한 이상반응으로 발작(seizure)을 일으킬 수 있으므로 모든 환자에게 phenytoin 등의 항경련제를 예방적으로 투여해야 한다. 치명적인 이상반응으로는 굴혈관폐쇄증후군(sinusoidal obstruction syndrome, SOS)을 유발할 수 있어 주의가 필요하다. 그 외 흔한 이상반응으로 고혈당, 저칼륨혈증, 저마그네슘혈증, 복통, 설사, 식욕부진, 오심, 구내염, 구토, 두통, 불면증, 불안증, 발열이 발생할 수 있다. 기타의 중대한 이상반응으로는 심장 눌림증(Cardiac tamponade), 난소 부전(ovarian failure), 폐렴, 폐섬유화, 폐출혈 등이 있다.¹⁰

1.2.2. Busulfan과 동종조혈모세포이식

Busulfan은 alloHSCT에서 전처치를 위하여 가장 널리 쓰이는 약물이다.^{16,17} Busulfan의 노출량(exposure)은 alloHSCT 이후 이상반응,⁵ GVHD,⁴ 생착 실패 및 거부반응¹⁸, 사망⁴ 등의 임상 성과와 연관성을 보이며 이에 대한 대표적 연구 사례는 다음과 같다.

○ 굴혈관폐쇄증후군

Dix 등⁵은 busulfan의 AUC가 1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 를 초과할 때 SOS 발생 위험이 높아진다는 연구 결과를 발표하였다. 동 연구진은 66 명의 환자에게 busulfan 1 mg/kg을 16 회 경구 투약하고 약동학과 SOS 발생을 관찰하였다. 그 결과 평가가 가능한 51 명의 환자 중 18 명에서 busulfan의 AUC가 1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 를 상회하였으며 그 중 6

명(33.3%)에서 SOS가 발생하였다. AUC가 1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 미만인 환자 33 명 중에서는 1 명(3.0%)에서만 SOS가 발생하였다(상대 위험도 = 11.1, P value = 0.0056).

○ 급성 GVHD 및 사망

Andersson 등⁴은 HLA가 일치하는 혈연 관계의 기증자로부터 alloHSCT를 받은 36 명의 CML 환자를 대상으로 IV(intravenous) busulfan의 per dose AUC에 따른 사망 위험, 항암제 독성, 급성 GVHD 발생률 간의 관련성을 분석하였다. 분석 결과, busulfan AUC가 증가하는 경우 위장관 독성(P value = 0.01), 간독성(P value < 0.01), 구내염(P value = 0.09), 급성 GVHD(P value < 0.01) 발생률이 증가하였다. 사망 위험 또한 busulfan AUC가 950–1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 의 범위 내에 도달한 경우 유의하게 낮았으며, 동 연구 결과를 바탕으로 IV busulfan의 치료역을 제안하였다.

○ 생착 실패 및 거부반응

Slattery 등¹⁸은 busulfan 16–30 mg/kg 및 cyclophosphamide 120–200 mg/kg 또는 8 g/m² 투약 후 HSCT를 시행한 환자를 대상으로 busulfan의 항정상태에서의 평균 혈중 농도와 생착 실패 및 항암제 독성 간의 상관성을 분석하였다. 다변량 Cox 분석 결과, busulfan 혈중 농도가 거부 반응의 유일한 결정 요인이었다(P value = 0.0154). 거부 반응을 피하기 위한 최소한의 busulfan 평균 혈중

농도는 HLA 일치 혈연 기증자의 경우 200 ng/mL, HLA 일치 비혈연 기증자의 경우 600 ng/mL이었다.

상기 연구 결과를 바탕으로 동 AUC 범위를 표적으로 한 TDM을 아래 식에 따라 시행할 것이 권장되고 있다.⁴

$$\text{교정 투여 용량 (mg)} = \text{실제 투여 용량 (mg)} \frac{\text{목표 AUC } (\mu\text{M} \cdot \text{min})}{\text{실제 AUC } (\mu\text{M} \cdot \text{min})}$$

$$\text{목표 AUC} = 1,125 \mu\text{M} \cdot \text{min}$$

1.2.3. Busulfan의 약동학적 변동

그러나 busulfan은 약동학적으로 개인 간 변동(inter-individual variability, IIV) 및 개인 내 변동(intra-individual variability)이 큰 약으로, AUC의 조절에 어려움이 있다. 이러한 변동을 줄이기 위하여 흡수 과정 상의 변동을 배제할 수 있는 주사제를 개발하고 이를 경구 제제에 우선하여 사용하고는 있으나,¹⁸ 간대사 등의 과정에서 여전히 큰 변동이 존재한다.¹⁹ 일각에서는 주사제의 경우 TDM이 굳이 필요치 않다고 주장하기도 하나, 이에 대하여 Salman 등²⁰이 최근 연구 결과를 통하여 반론을 제기한 바 있다. Salman 등은 2017년 alloHSCT 환자 73 명에서 busulfan의 기존 고정 용량(3.2 mg/kg/day)과 TDM 용량을 비교한 연구 결과를 발표하였는데, 이에 따르면 기존 고정 용량은 TDM 용량에 비하여 39 mg/day가 부족하였으며 그 차이는 통계적으로 유의하였다(P value < 0.001, Figure 4). 동 연구를 통하여 busulfan 주사제 또한 큰 약동학적 개체차를 보이며 busulfan 주사제의 용량을

결정할 때에, 특히 유전적 성향이 다른 환자에서의 용량 결정 시에 TDM과 같은 용량 최적화 방안이 여전히 필요함이 확인되었다.



Figure 4. Difference between the total fixed dose and the total therapeutic drug monitoring dose of busulfan

The upper and lower bars (whiskers) of the box plot represent the 90th and 10th percentiles, respectively. The horizontal bar at the center of the box plot represents the median value, and the top and bottom of the box plot represent the 75th and 25th percentiles, respectively.

Adapted from Salman B *et al. Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy.* (2017)

그 외에 체중 및 체표면적(body surface area, BSA),²¹ 나이,²² 질환 상태,^{11,14} 간기능,²³ azoles 및 phenytoin과의 약물상호작용,^{23,24} 일주기리듬(circadian rhythmicity)²² 등도 busulfan의 약동학에 영향을 미친다고 보고된 바 있으나 추가 연구가 필요한 상황이다. 다음은 busulfan의 약동학적 변동 유발 요인에 대한 연구 결과의 예시이다.

○ 체중 및 체표면적

Vassal 등²¹은 27 명의 소아(평균 연령 5.4 세)를 대상으로 busulfan을 체중 기반 용량과 BSA 기반 용량으로 투여하였을 때의 약동학을 비교하였다. 연구 대상자에게 4 일 간 기존 용량인 16 mg/kg 대신 busulfan 600 mg/m²(체중당 용량으로 환산 시 평균 24.8, 범위 17.8–29.2 mg/kg에 해당)를 투여하고 그 혈장 농도를 관찰하였다. 그 결과, 전신 노출량이 기존의 16 mg/kg 투여 시에 비하여 유의하게 증가하였고($6,404 \pm 2,378$ ng · h/mL vs. $3,918 \pm 1,170$ ng · h/mL; P value = 0.003), 이는 16 mg/kg를 투여 받은 성인의 전신 노출량과 유의한 차이가 없었다. 그러나 이 때 전신 노출량의 범위는 3,566–13,129 ng · h/mL로 여전히 큰 약동학적 개체차가 존재하였다. 이에 개인의 특성을 더욱 고려함으로써 busulfan의 최적 용량을 산출할 수 있는 방안의 필요성을 제기하였다.

○ 나이

Hassan 등²²은 5 세 미만의 소아 BMT 환자 27 명에게 전처치

요법의 일환으로 4 일 간 1 mg/kg/day의 busulfan을 투여하였다. 이 때 최소 혈중 농도는 평균 237 ng/mL로 성인(607 ng/mL) 또는 5 세 이상의 소아(573 ng/mL)에서 관찰된 값보다 낮았다. 마지막 용량 투여 후의 AUC 또한 5 세 미만의 소아에서 성인 또는 5 세 이상의 소아에 비하여 유의하게 낮았다(각각 2,315 ng · h/mL vs. 6,134 ng · h/mL vs. 5,937 ng · h/mL). 소실 반감기는 5 세 미만의 소아에서 2.05 h로 성인의 2.59 h 또는 5 세 이상 소아에서의 2.79 h에 비하여 짧았다. CL는 5 세 미만의 소아에서 7.3 mL/min/kg로 성인의 2.7 mL/min/kg 또는 5 세 이상 소아에서의 3.02 mL/min/kg에 비하여 유의하게 높았다.

○ 질환 상태

Hassan 등¹⁰은 20 명의 소아 BMT 환자에게 busulfan 1.90–6.02 mg/kg/day를 경구 투여하고 그 약동학을 분석하였다. 그 결과 busulfan의 첫번째 및 마지막 투여 시의 소실 속도가 유전성 질환 환자에서(반감기 1.93 h 및 1.71 h) 백혈병 환자에 비하여(반감기 3.16 h 및 2.70 h) 유의하게 빨랐다. busulfan의 첫번째 및 마지막 투여 시의 AUC는 백혈병 환자에서(5,527 ng · h/mL 및 4,690 ng · h/mL) 유전성 질환 환자에 비하여(2,768 ng · h/mL 및 2,029 ng · h/mL) 유의하게 빨랐다. CL는 유전성 질환 환자에서 백혈병 환자에 비하여 42% 높았다.

Gibbs 등²²은 279 명의 청소년 및 성인 환자에게 busulfan을 경구 투여한 후 apparent oral clearance(CL/F)를 산출하였다. Busulfan의 CL/F는 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 환자(n = 10)에서 CML 환자(n = 72)에 비하여 약 32% 감소하였다.

○ 간기능

Gibbs 등²³은 0-16 세의 소아 alloH SCT 환자 135 명에서 busulfan의 CL/F를 산출하고 체중 및 BSA로 보정하였다. 그 결과 보정된 CL/F는 0-4 세에 비하여 9-16 세에서 비하여 유의하게 낮았다(체중 보정 시 49%, BSA 보정 시 30%, P value < 0.001). 연구진은 소아 busulfan의 CL/F가 나이가 어린 소아에서 더욱 큰 원인 중 하나가 초회 통과 효과(first-pass effect)의 항진 때문이라고 가정하였다. 이를 검증하기 위한 실험으로, busulfan의 포함률을 건강한 소아 1-3 세와 9-17 세의 조직 검체를 가지고 인큐베이션 내에서 비교하였다. 그 결과, 1-3 세의 조직 검체에서 77% 높은 busulfan의 포함률이 관찰되었다(P value = 0.037). 연구진은 busulfan 포함에 관여하는 주요 효소가 GSTA1이라는 이전 연구 결과를 참고하여 busulfan CL/F의 연령 의존성이 GSTA1 효소의 발현 차이 때문일 가능성을 제시하였다.

○ 약물상호작용

Buggia 등²⁵은 BMT 환자 중 itraconazole 병용 환자 13 명, 항진균제를 병용하지 않는 matched control 26 명, fluconazole을 병용하는 matched control 13 명에서 busulfan의 약동학 및 약력학을 비교하였다. Itraconazole 병용 환자에서의 busulfan CL는 fluconazole 사용자 및 항진균제 비사용자에 비하여 평균 20% 감소하였다(평균 CL 7.653 ± 1.871 L/h/m² vs. 10.103 ± 2.007 L/h/m² vs. $9.373 \pm$

1.702 L/h/m², P value < 0.01). 동 연구에서 itraconazole이 busulfan의 약동학에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되었으나 이러한 약물상호작용의 기전은 확실히 밝혀지지 않았으며 인체 대사 연구를 통한 확인이 필요한 상황이다.

Hassan 등²⁴은 항경련제와 busulfan의 약물상호작용을 연구하였다. 연구 대상은 전처치 약물로 busulfan을 투여 받은 BMT 환자 17명이었다. 이들은 busulfan으로 인한 경련 예방 약제로 phenytoin 또는 diazepam을 투여받았다. 이 때 phenytoin 사용 환자에서는 busulfan의 초회 투여 시에 비하여 마지막 투여 시에 유의하게 높은 CL(2.80 ± 0.78 mL/min/kg vs. 3.32 ± 0.99 mL/min/kg), 낮은 AUC($6,475 \pm 2,223$ ng·h/mL vs. $5,412 \pm 1,534$ ng·h/mL), 짧은 소실 반감기(3.94 ± 1.10 h vs. 3.03 ± 0.57 h)가 관찰되었다. Diazepam 사용 환자에서는 상기와 같은 약동학적 지표의 차이가 관찰되지 않았다. 또한 항정 상태에서의 busulfan 혈장농도가 phenytoin 사용자 7명 중 4명에서, diazepam 사용자 8명 중 1명에서 감소하였다. 연구진은 동 분석 결과를 바탕으로 예방적으로 사용된 phenytoin이 busulfan의 약동학적 변동을 유발한다고 보고하였다.

기타 busulfan과의 약물상호작용이 보고된 약제로는 metronidazole, ketoconazole, thioguanine, ketobemidone, acetaminophen이 있다(Table 2).¹⁰

○ 일주기리듬

Hassan 등²²은 5세 미만의 소아 BMT 환자 27명에게 전처치

요법의 일환으로 4 일 간 1 mg/kg/day의 busulfan을 투여하고 그 혈장 농도를 측정하였다. 이 때 일부 환자에서 busulfan의 혈장 농도는 낮 시간에 비하여 밤 중에 최대 3 배까지 증가하여, 일주기리듬에 따른 변동 가능성을 시사하였다.

Table 2. Drugs interacting with busulfan

Drugs	Drug interactions
Metronidazole	Concurrent use of busulfan and metronidazole may result in significantly increased busulfan trough levels and an increased risk of busulfan toxicity.
Ketoconazole	Concurrent use of busulfan and ketoconazole may result in increased busulfan exposure.
Thioguanine	Concurrent use of thioguanine and busulfan may result in an increased risk of nodular regenerative hyperplasia of the liver.
Itraconazole	Concurrent use of busulfan and itraconazole may result in an increased risk of busulfan toxicity (myelosuppression, hemorrhagic cystitis, neurotoxicity, busulfan lung).
Ketobemidone	Concurrent use of busulfan and ketobemidone may result in an increase in busulfan and ketobemidone plasma levels.
Phenytoin	Concurrent use of busulfan and phenytoin may result in decreased plasma concentrations of busulfan.

Acetaminophen Concurrent use of busulfan and
acetaminophen may result in reduced
busulfan clearance.

Adapted from IBM Micromedex®

1.3. Glutathione S-Transferase (GST)

1.3.1. GST의 유전적 다형성

상기 약동학적 변동은 busulfan을 1차적으로 대사하고 무독화하는 효소인 GST 코딩 유전자의 다형성으로 일부 설명이 가능하다. GST는 2상 무독화 효소 중의 하나로 glutathione의 포합에 관여한다. GST superfamily에 속하는 일련의 동종 효소(isozyme), 즉 GSTA1, GSTM1, GSTP1 및 GSTT1은 모두 다형성이 높은 유전자에 코딩되어 있다. 이들 중 활성이 가장 강한 GSTA1 코딩 유전자의 promotor region에는 4개의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 연관 불평형(linkage disequilibrium)을 이루고 있으며, 이것이 *GSTA1* *B일 때 효소 발현이 감소한다(*A [-631T, -567T, -69C, -52G]/*B [-631G, -567G, -69T, -52A], G-52A: rs3957356).²⁵⁻²⁷ GSTM1과 GSTT1은 각각 GSTA1이 가지는 효소 활성의 46%, 18%를 가지는데 이들을 코딩하는 유전자에 결손(deletion)이 있는 경우 해당 유전자가 발현되지 않아 효소의 생산이 이루어지지 않는다.²⁸ *GSTP1* 313A>G(rs1695)는 효소 발현을 감소시킨다.^{29,30}

GST 효소의 유전적 다형성은 busulfan의 약동학에 영향을 미친다고 알려진 환자의 연령, 체중, 인종, busulfan의 제형, 질환 상태, 이식 특성, 약물상호작용 등의 여러 임상적 요인과 더불어 busulfan의 약동학적 및 약력학적 변동, 그리고 이로 인한 임상 성과의 차이를 유발할 수 있을 것이다. 이론적으로 *GSTA1* *B를 보유한 경우 busulfan의 대사율이 저해됨에 따라 그 혈중 농도 및 AUC가 증가하고

이로 인하여 SOS, GVHD, TRM과 같은 독성 반응이 증가할 수 있다. 반대로 *GSTA1* wild-type의 경우, busulfan의 대사율이 높아 노출이 감소하고 이로 인하여 busulfan의 유효성 부족에 해당하는 생착 실패 또는 거부 반응, 재발 등이 증가할 수 있을 것이다(Figure 5).

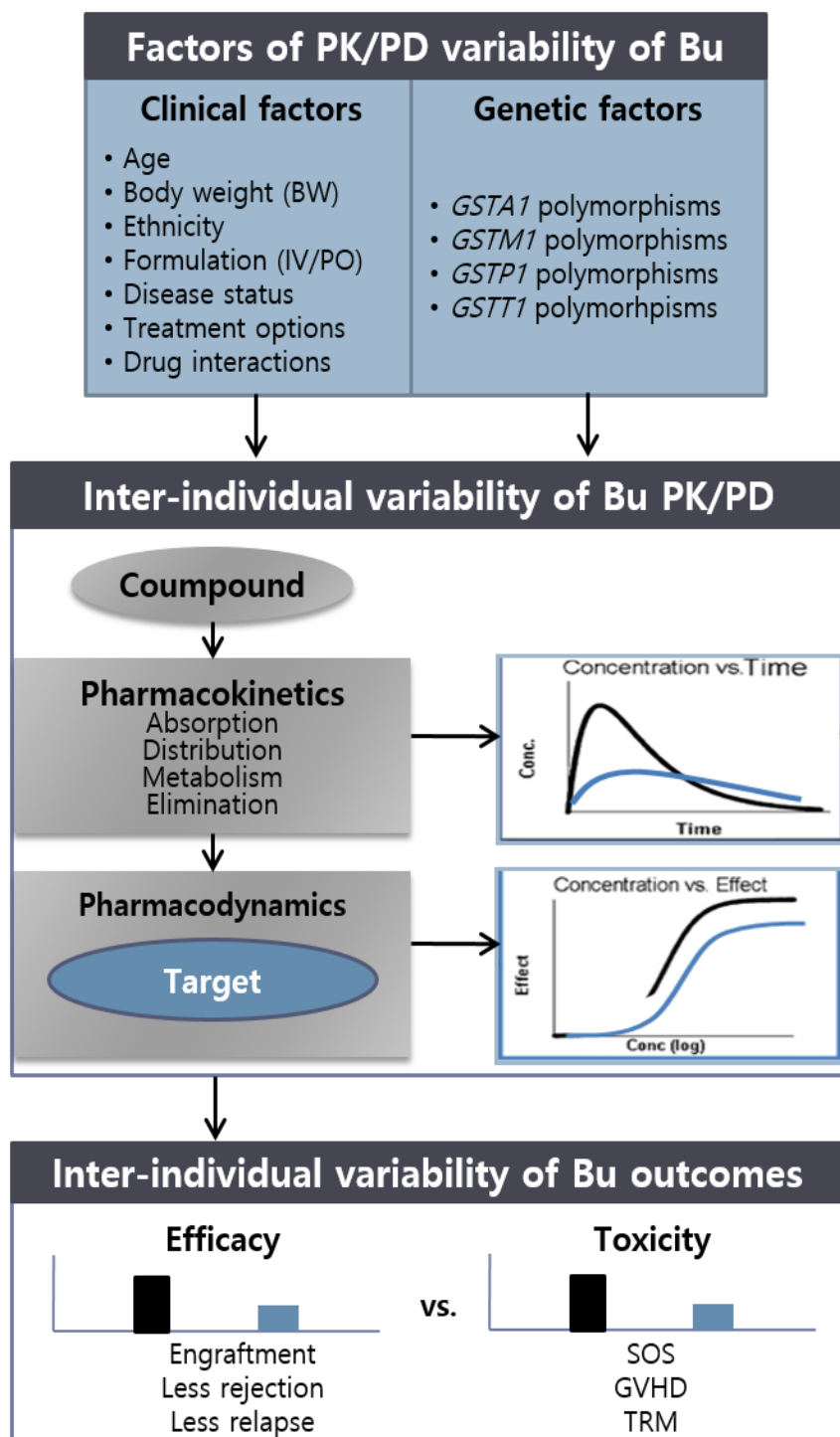


Figure 5. Inter-individual variability in pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical outcomes of busulfan according to

clinical and genetic factors

PK = pharmacokinetic, PD = pharmacodynamics, Bu = busulfan, SOS

= sinusoidal obstructive disease, GVHD = graft versus host disease,

TRM = treatment related mortality

1.3.2. *GST*의 유전적 다형성에 대한 기존의 약동학 연구

이러한 유전적 다형성이 busulfan의 약동학에 미치는 영향에 대하여 몇몇 전통적 방법의 약동학 연구가 이루어진 바 있으나 그 결과가 서로 상이하다. Ten Brink 등³¹ 및 Kim 등³²은 *GSTA1* 유전형이 busulfan의 CL에 영향을 미침을 확인하였으나 Abbasi 등³³은 유의한 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 다음은 관련 연구의 상세 내용이다.

○ Ten Brink 등의 연구

66 명의 성인 alloHSCT 환자에서 *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*의 유전 변이가 busulfan의 약동학에 미치는 영향을 분석하였다. Busulfan의 초회 투여 후 혈액을 2 회 채취하여 HPLC(high-performance liquid chromatography)로 혈중 농도를 분석하였다. 분석 결과, *GSTM1*과 *GSTP1*은 busulfan의 약동학에 영향을 미치지 않았으나, *GSTA1*은 busulfan의 CL를 14% 감소시켰으며 노출량을 증가시켰다.

○ Kim 등의 연구

58 명의 성인 alloHSCT 환자에서 *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*의 유전 변이가 busulfan의 약동학에 미치는 영향을 분석하였다. 다변량 선형 회귀분석 결과, *GSTA1* *B(P value = 0.004), *GSTM1/GSTT1*

이중 결손(double-null, P value = 0.039), 체중(P value = 0.001)이 IV busulfan의 CL 감소와 유의한 상관성을 보였다. IV busulfan의 CL는 *GSTA1* *A/*A 및 *GSTM1/GSTT1* 이중 결손을 가진 자와 *GSTA1* *A/*B 보유자이면서 *GSTM1/GSTT1*의 결손이 하나도 없는 자에서 유사하였다. 동 연구진은 *GST* 유전형이 IV busulfan의 용량 산출에 유용한 정보가 될 가능성을 제시하였다.

○ Abbasi 등의 연구

*GSTA1*과 *GSTM1*의 유전형이 busulfan의 CL에 미치는 영향을 분석하였다. Busulfan을 경구로 투여하였을 때에는(n = 95) *GSTA1*이 그 CL에 유의한 영향을 미쳤다(P value = 0.008). 그러나 busulfan을 정맥 투여하였을 때는 *GSTA1*과 *GSTM1* 모두 그 CL와 유의한 상관성을 보이지 않았다. 동 연구 결과는 경구 또는 정맥으로 투여된 busulfan의 용량 산출이 단순히 *GSTA1*이나 *GSTM1*의 유전형만으로 최적화될 수 없음을 시사하였다.

1.3.3. *GST*의 유전적 다형성에 대한 기존의 임상 성과 연구

*GST*의 유전적 다형성이 busulfan의 임상 성과에 영향을 미치는지 또한 연구된 바 있으나 역시 그 결과는 상이하였다. Rocha 등은 *GSTP1*과 만성 GVHD의 관계를 확인하였으나³⁴ Goekkurt 등은 *GST* 효소의 유전적 다형성과 간독성 간에 상관성이 없음을 보고하였다.³⁵ 다음은 관련 연구의 상세 내용이다.

○ Rocha 등의 연구

HLA 일치 기증자 107 명과 그로부터 alloHSCT를 받은 환자 107 명 각각에서 busulfan을 포함한 전처치 약물 및 GVHD 예방 약물의 대사와 관련된 효소의 유전적 다형성을 분석하였다. 다변량 분석 결과, 기증자의 *GSTP1* 변이가 있는 경우 만성 GVHD의 2년 누적 발생률이 상대적으로 높았다(63.0% vs. 40.8%, p value = 0.0030).

○ Goekkurt 등의 연구

AlloHSCT를 위하여 busulfan, cyclophosphamide, GVHD 예방을 위하여 methotrexate, cyclosporine을 사용한 84 명의 환자에서 *MTHFR*(methylene-tetrahydrofolate-reductase) 및 *GSTA1*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1*의 유전형에 따른 간독성 발생률을 분석하였다. 다변량 분석 결과 *MTHFR* A1298C 외의 유전형은 간독성 발생에 유의한 영향을 미치지 않았다.

1.4. 집단약동학

1.4.1. 집단약동학의 개념

집단약동학은 피험자에서 얻은 약동학 자료를 각 개인 별로 따로 분석하지 않고 관심 집단에서 얻은 모든 자료를 통합하여 하나의 모델을 수립함으로써 약동학을 연구하는 학문이다. 집단약동학 모델은 약동학적 특성을 수리통계학적 형태로 기술함으로써 약동학의 예측 및 기술이 용이하게 하며, 모델링 과정에서 개체 간(inter-subject), 개체 내(intra-subject), 그리고 잔차(residual) 변동(variability)을 고려함으로써 산발적이고 적은 자료의 분석을 가능하게 한다는 특징을 가진다. 또한 약동학적 지표에 영향을 미치는 각 개인의 특성을 공변량으로 모델에 포함함으로써 약동학적 개체차의 결정 요인과 그 영향력을 규명할 수 있다. 상기 모델링 과정을 통하여 공변량의 효과로 설명되지 않는 잔차가 충분히 감소한 경우, 해당 모델을 기반으로 한 개인별 용량·용법의 산출 또한 가능하다.³⁶

1.4.2. 집단약동학의 응용

집단약동학 이전의 전통적인 약동학 연구의 개념은 1960년대 이전에 태동하였다. 당시 전통적인 약동학 연구의 활용 분야는 주로 각 개인의 혈중 약물 농도 프로파일을 제시하는 것으로 약물의 농도-효과 간 상관 관계를 규명할 수 없다는 등의 제약이 있었다.³⁷ 이에 약물의

약동학 및 약력학적 특성을 서로 연관시키고 정량적으로 예측하고자 1979년도에 이르러 계량적 방법론을 활용한 집단약동학의 개념이 도입되었다.³⁸

이후 집단약동학은 관련 연구가 활발하게 수행되고 그 실효성이 알려짐에 따라 생물학적 동등성 평가, 약물 대사체의 약동학 모델링, 약물유전체학(pharmacogenomics), 신약개발 과정에서 전임상시험 자료로부터 임상시험을 설계하기 위한 allometric scaling, 임상시험 결과의 시뮬레이션 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다.³⁹ 이에 따라 국외 및 국내 의약품 허가 당국에서도 관련 규제 지침을 개발하고 이를 의약품의 심사·평가 및 임상시험 등에 적용하고 있다. 대표적인 집단약동학 관련 지침으로 미국 FDA(Food and Drug Administration)의 "Guidance on population pharmacokinetics(1999)", 유럽 EMA(European Medicines Agency)의 "Reporting the results of Population Pharmacokinetic Analyses(2006)", 한국 식품의약품안전처의 “의약품 개발 시 집단 약동학 활용을 위한 가이드라인(2015)” 등이 있다. 특히 EMA에서는 “Use of Pharmacogenomic methodologies in the Pharmacokinetic Evaluation of medicinal products(2010)”에서 약물유전체 분석 시 집단약동학 분석법에 활용에 관한 지침을 제공한 바 있다.

1.4.3. 집단약동학의 분석 원리

집단약동학 분석은 1970년대에 Sheiner⁴⁰ 등에 의하여 개발된 소프트웨어인 NONMEM®을 이용하여 주로 이루어진다.

NONMEM®에서는 혈중약물농도에 대한 수학적 모델에 고정 효과(fixed effect)와 임의 효과(random effect)가 있다고 가정하는 비선형 혼합 효과 모형(Nonlinear mixed effect modeling, NONMEM)을 적용한다. 고정 효과는 혈중약물농도의 변동에 영향을 미치는 요인 중 측정 및 예측이 가능한 요인으로, 연구 대상 집단의 평균 CL 추정치, 그리고 이 집단 평균 CL와 각 개인의 CL 간의 차이를 유발하는 공변량의 효과를 포함하며, 모델링 시 θ 로 표현된다. 그러나 공변량을 고려하여도 각 개인의 실제 CL와 모델을 통하여 추정한 CL 간에 오차가 발생하게 마련이다. NONMEM®에서는 이렇게 약동학 지표를 추정함에 있어 예측 불가능한 변동을 η 로 명명하고 이들이 고유의 분포를 가진다고 가정하며 IIV 모델링을 통하여 이들의 추정치를 구한다. 한편 CL의 정확한 추정치를 산출하여 이로부터 혈중약물농도를 계산하여도, 실험상의 오류, 공변량으로 설명되지 않는 개인 내의 변동, 모델의 불완전성 등 다양한 원인으로 인하여 실제 측정한 혈중약물농도와의 차이가 발생할 수 있다. 이러한 예측치와 실제 관측치 간의 오차는 ε 로 명명하고 잔차 변동(residual variability) 모델링을 통하여 추정한다. 여기서 η 를 추정하기 위한 IIV 모델과 ε 을 추정하기 위한 잔차 변동 모델은 임의 효과를 설명하는 부분이다. NONMEM®은 고정 효과 뿐 아니라 이러한 임의 효과를 추가적으로 모델링하고 추정함으로써 적은 수의 자료, 산발적인 자료를 가지고도 혈중약물농도에 미치는 다양한 요인의 영향력을 분석할 수 있도록 한다(Figure 6).⁴⁰

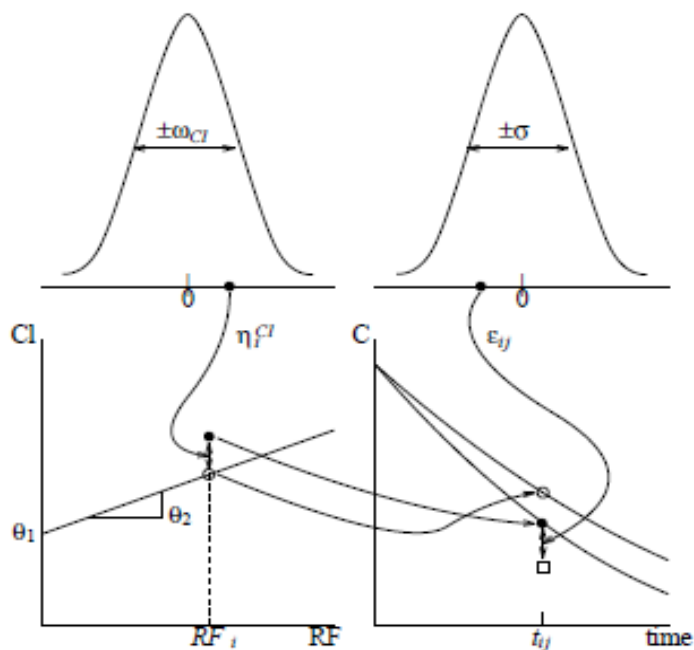


Figure 6. Random and fixed effects in population pharmacokinetic analysis using NONMEM®

Random and fixed effects influence observation, C_{ij} , from the population point of view. Open circle, lower left, is population parameter predicted clearance, closed circle is true clearance for i_{th} individual which differs from population prediction by η_i^{Cl} , chosen randomly from a distribution (upper left) with mean 0 and SD ω^{Cl} . Similarly, lower right, the observed C at time t_{ij} (open square) differs by ϵ_{ij} from the true value (closed circle) by an error ϵ_{ij} , chosen independently from a distribution with mean 0 and SD σ . The C corresponding to the population-based prediction is also shown (upper curve, open circle).

Adapted from Beal SL and Sheiner LB. NONMEM User's Guides. (1998)

1.4.4. 집단약동학의 기존 연구

상기 집단약동학적 방법론을 적용하여 GST 효소의 유전적 다형성이 busulfan의 약동학에 미치는 영향을 분석한 연구가 소아 환자를 대상으로 수행된 바 있다. 그러나 Gaziev 등과 Johnson 등⁴²은 *GSTA1* 유전형과 busulfan CL 간에 유의한 상관관계가 있다고 보고한 반면 Zwaveling 등⁴³은 그렇지 않다고 보고하여 서로 상이한 결과를 발표하였다. 또한 성인을 환자를 대상으로 한 연구가 전무하였다. Busulfan은 그 약동학적 특성이 소아와 성인에서 큰 차이를 보이기 때문에⁴⁴ 소아 대상 연구에서 일관된 연구 결과가 도출되었더라도 이를 성인에 적용할 수는 없었을 것이며, 따라서 동 주제에 대하여 성인 환자를 대상으로 한 추가 집단약동학 연구가 필요한 상황이다. 소아 환자를 대상으로 busulfan의 약동학에 대한 *GST* 유전형의 영향력을 분석한 집단약동학 연구 사례는 다음과 같다.

○ Gaziev 등⁴¹의 연구

기저 간손상이 있으며 thalassemia의 치료를 위해 IV busulfan 투여 후 alloHSCT를 시행한 소아 환자 71 명을 대상으로 busulfan의 약동학과 임상 성과를 연구하였다. Busulfan은 6 시간 간격으로 투여하였고 용량은 TDM을 통해 AUC가 900–1,350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 내에 도달하도록 조절하였다. Busulfan을 5, 9, 13 회 투여했을 때 각각 78%, 81%, 87%의 환자가 표적 AUC에 도달하였다. 집단약동학 모델 수립 결과, busulfan CL의 변동을 결정하는 가장 중요한 공변량은 체중이었고, *GSTA1* *B 보유자의 busulfan CL는 wild-type 환자에 비해 10%

낮았다.

○ Johnson 등⁴²의 연구

혈연 또는 비혈연 기증자의 골수 또는 제대혈의 조혈모세포를 이식 받은 29 명의 소아 환자를 대상으로 *GSTA1*, *GSTP1*, 및 *GSTM1*의 유전형이 busulfan의 대사에 미치는 영향에 대한 집단약동학 분석을 후향적으로 수행하였다. 분석 결과, *GSTA1* *B 보유자에서 비보유자에 비해 busulfan의 AUC와 항정 상태의 혈중 농도가 2.6배 증가하였다(p -value = 0.01). 집단약동학 모델에서 *GSTA1* *B는 busulfan의 CL를 30% 감소시켰다.

○ Zwaveling 등⁴³의 연구

AlloHSCT를 위한 골수제거 전처치의 일환으로 busulfan을 4 일간 투여 받은 77 명의 소아 환자를 대상으로 *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, 및 *GSTT1*의 유전적 다형성이 busulfan의 약동학에 미치는 영향에 대한 후향적 집단약동학 분석을 수행하였다. Busulfan은 1 일 1 회 또는 4 회 분할 투여하였다. 해당 유전자의 유전형은 pyrosequencing으로 분석하였다. Busulfan의 약동학은 비선형 혼합 효과 모형으로 분석하였다. 분석을 통하여 집단약동학과 약물유전체의 혼합 모형을 수립하였다. 동 모형에서 체중이 busulfan의 약동학적 특성을 결정하는 가장 중요한 요인으로 확인되었다. *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* 및 해당 유전형의 조합에 따른 busulfan 약동학의 유의한 차이는

관찰되지 않았다. 동 연구에서는 소아 환자에서 *GST*의 유전적 다형성은 busulfan의 약동학적 변동과 상관성이 없다는 결론을 지었다.

1.5. 연구의 목적

본 연구에서는 성인 alloHSCT 환자에서 IV busulfan의 약동학과 *GST* 유전적 다형성 등의 공변량 간의 관계를 종합적으로 분석하고 이를 정량적으로 기술하는 집단약동학 모델을 개발하고자 하였다. *GST* 유전형과 busulfan의 약동학이 임상 성과에 미치는 영향 또한 분석하였다.

Chapter 2. Methods

2.1. 연구 대상자

연구 대상 환자는 2009년부터 2011년까지 서울대학교병원에서 alloHSCT을 받은 환자 중 이식 전처치로 busulfan을 정맥으로 투여 받은 자이다. 포함 기준은 18 세 이상 성인의 악성 및 비악성 혈액질환 환자로 본 연구 참여에 서면 동의한 자였다. 제외 기준은 2차 이상의 alloHSCT 환자, 연구 결과에 영향을 미칠 수 있는 중증의 동반 질환이 있는 자, 또는 동의를 철회한 자였다. 본 연구는 헬싱키 선언 및 ICH(International Council of Harmonization)-GCP(Good Clinical Practice)를 준수하여 윤리적 원칙과 해당되는 규제 요구사항에 따라서 수행되었다. 본 연구는 서울대학교병원 기관윤리심의위원회의 승인을 받았다(IRB No. C-0908-075-292).

2.2. 약물 투여

Busulfan(IV Busulfex [busulfan] injection: Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd, Tokyo, Japan)은 1 회당 0.8 mg/kg의 용량으로 2 시간에 걸쳐 정맥으로 주입하였다. 총 36 명의 환자 중 15 명에게는 골수제거 전처치인 BuCy(busulfan + cyclophosphamide) 요법의 일환으로 상기 용량·용법의 busulfan을 이식 -8 일부터 -5 일까지 6 시간마다 총 16 회 투여하고, 이후 이식 -3 일부터 -2 일까지 cyclophosphamide 60 mg/kg을 1 일 1 회 정맥 투여하였다. 나머지 21 명에게는 비골수제거 전처치인 BuFlu(busulfan + fludarabine) 요법의 일환으로 이식 -6 일부터 -3 일까지 동일 용량·용법의 busulfan을 fludarabine 30 mg/m²와 함께 1 일 1 회 정맥 투여하였다.

모든 환자에게 busulfan에 의한 발작의 예방을 위하여 phenytoin을, 진균 감염 예방을 위하여 fluconazole 또는 micafungin을, GVHD의 예방을 위하여 cyclosporine(및 methotrexate)을 투여하였다.

2.3. 혈액 채취

Busulfan의 혈중 농도와 유전형을 분석하기 위한 혈액은 busulfan 주입 전, 첫 번째 용량 주입 후 2, 4, 6 시간째, 그리고 마지막 용량 주입 후 6 시간째에 중심 정맥으로부터 채취하였다. 첫 번째 용량 주입 후 혈액 채취 시점은 busulfan의 허가사항¹⁰에 기재된 TDM을 위한 혈액 채취 시점과 동일하게 2, 4, 6 시간째로 선정하였다. 또한 항정 상태의 혈중약물농도를 측정할 수 있도록 마지막 용량 주입 후에도 채혈을 실시하였다. 추가 채혈에 동의한 4 명의 환자에게는 busulfan 첫 번째 용량 주입 후 1, 2, 2.5, 3, 4, 6 시간째에 dense sampling 하였다. 실제 채혈 시각은 분 단위로 기록하였으며 혈액은 헤파린 유리 튜브에 수집하였다. 그 중 busulfan 주입 전에 채취한 전혈 4 mL에서 DNA를 추출하였고, 각 샘플 1 mL를 4 °C에서 3,000 rpm으로 10 분 간 원심분리하여 얻은 혈장에서 busulfan을 정량하였다. 모든 샘플은 분석 전까지 -70 °C에 보관하였다.

2.4. Busulfan 혈중 농도 분석

busulfan의 혈장 농도는 HPLC/MS/MS(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 내부 표준 물질로 Ammonium adducted busulfan-d₈을 사용하였다. busulfan과 내부 표준 물질을 C18(3 μ m, 2.0 mm \times 150 mm) 컬럼으로 분리하였다. 이동상은 5 mM ammonium acetate와 acetonitrile로 구성하였다. Busulfan의 검량선 작성을 위하여 표준 물질을 acetonitrile에 녹여 농도가 1 mg/mL인 저장 용액을 제조한 후 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하고, 증류수 : acetonitrile (50 : 50, v/v, 이하 '50% acetonitrile')로 희석하여 0.4, 1, 2, 4, 10, 20 및 40 μ g/mL의 농도가 되도록 표준 물질 작업 용액을 만들어 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다. Busulfan의 내부 표준 물질인 busulfan-d₈ 표준 물질을 dimethylsulfoxide에 녹여 1 mg/mL인 저장 용액을 제조한 후 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하고, 이를 50% acetonitrile로 희석하여 1 μ g/mL인 내부 표준 물질 작업 용액을 만들어 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다. -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였던 공혈장(항응고제로 heparin sodium 사용)에 busulfan 표준 물질 작업 용액을 첨가하여 busulfan의 혈장 농도가 각각 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000 ng/mL가 되도록 표준 측정 시료를 만들었다. 각각의 표준 측정 시료 100 μ L를 polypropylene tube에 넣고 내부 표준 물질 작업 용액 20 μ L와 acetonitrile 200 μ L를 가하여 1 분간 잘 섞은 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하였다. 이 중 100 μ L를 취하여 5 mM ammonium acetate 100 μ L와 잘 섞은 후 그 중 10 μ L를 취하여

HPLC/MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부 표준 물질의 피크 면적에 대한 busulfan의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. busulfan의 최저 정량 한계는 20 ng/mL이었고 검량선은 20-2,000 ng/mL의 농도 범위 내에서 선형이었다. 정확도와 정밀도는 15% 이내로 적절하였다.⁴⁵

2.5. 유전형 분석

말초 혈액의 림프구에서 추출한 DNA로부터 다음의 유전형을 분석하였다: *GSTA1* G-52A(rs3957356, haplotype *A/*B를 결정), *GSTP1* A313G(rs1695), *GSTM1* 결손, *GSTT1* 결손. *GSTA1*은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 및 ABI 3730xl automated sequencer(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)를 이용한 직접염기서열법(direct sequencing)으로 분석하였다. *GSTP1*은 SNaPshot(ABI PRISM SNaPshot Multiplex kit, Foster City, CA, USA)으로, *GSTM1*과 *GSTT1*은 PCR(polymerase chain reaction)로 분석하였다.⁴⁶ Table 3에 genotyping 분석에 사용된 primer sets와 Tm을 기술하였다.

Table 3. The primer sets and T_m used for the genotyping assays

Polymorphisms	Primer sequence 5' –3'	T _m
<i>GSTA1</i> G–52A [†]	Forward: CAGGAAACAGCTATGACCgatgaatccag gtgatgaat Reverse: GTAAAACGACGGCCAGTCAACTGAA TTCCAGGTCCTA	60
<i>GSTP1</i> A313G	Forward: GGTGGACATGGTGAATGACG Reverse: GGCACAAGAAGCCCCTTTC Genotyping: TGGTGTAGATGAGGGAGA	58
<i>GSTM1</i> deletion	Forward: GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC Reverse: GTTGGGCTCAAATATACGGTGG	65
<i>GSTT1</i> deletion	Forward: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC Reverse: TCACCGGATCATGGCCAGCA	65

[†]The sequencing primers for *GSTA1* G–52A were the same as those used for the polymerase chain reaction (PCR) amplification

2.6. 집단약동학 분석

2.6.1. 집단약동학 모델 개발

집단약동학 모델 개발 시 구조 모델(base model) 개발, 오차 모델(error model) 개발, 공변량의 반영, 모델의 타당성 검토 과정을 거쳤다. 구조 모형은 1차 속도 소실의 one compartment open 모델을 사용하였다.¹¹ 이 때 분포 파라미터는 CL와 V으로 하였다. 오차 모델(error model)의 경우, 잔차 오차(residual error)에는 combined additive-proportional model을, IIV에는 exponential model을 활용하였다. 다음으로, CL에 대한 다음 공변량의 영향을 평가하였다: 나이, 성별, 키, 체중, 체표면적, 혈청 creatinine, 사구체 여과율, 혈청 albumin, total bilirubin, 혈청 ALP(alkaline phosphatase), 혈청 AST(aspartate transaminase), 혈청 ALT(alanine transaminase), 약물상호작용(azoles), 및 *GSTA1*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1*의 유전형이. CL에 대한 체중의 영향은 전형적인 방법에 따라 power model로 기술하였다. 기타 공변량과 CL의 관계에 대해서는 additive, combined additive-proportional, exponential, power model을 스크리닝 하였다. 집단약동학 모델을 유의하게 개선하는 공변량의 선택을 위하여 stepwise procedure를 적용하였다. 약동학 모델에 공변량을 추가한 후 목적 함수(minimum objective function, MOF) 값 감소 폭이 3.84(P value < 0.05에 상응)⁴⁰를 초과한 경우 공변량의 고려가 약동학 모델을 유의하게 개선한 것으로 평가하였다. 반대로 약동학 모델에서 공변량을 하나씩 제거하면서 MOF 값의 증가 폭이 3.84를 초과한 경우 해당

공변량이 유의미한 것으로 평가하였다. FOCE(first-order conditional estimation) 방법으로 모델의 파라미터를 추정하였다.

Busulfan 초회용량 투약 후의 $AUC_{0-\infty}$ 는 투여량을 CL_{ind} (NONMEM®을 이용하여 추정한 각 개인의 CL)로 나누어 산출하였다.

2.6.2. 모델 검증

모델은 Goodness-of-fit plot을 통한 visual inspection, bootstrap, 그리고 시각적 예측 점검(visual predictive check, VPC)방법으로 검증하였다.⁴⁷ bootstrap을 위하여 데이터셋 1,000개를 생성하고 각 파라미터 추정치의 95% 신뢰구간을 구한 후, 이를 본래 데이터셋의 파라미터 추정치와 비교하였다. VPC를 위하여 혈중약물농도 관측치의 5, 50, 95% 백분위 수, 그리고 1,000 회의 시뮬레이션을 통하여 산출한 이들의 95% 신뢰구간을 그래프로 나타내었다.

2.6.3. 소프트웨어

NONMEM® version 7.2(ICON plc. Dublin. Ireland)를 활용하여 집단 약동학 모델을 개발하였고, 공변량의 평가 및 모델의 내적 타당성 평가 시에 PsN version 3.5.3과 R software(www.R-project.org)를 활용하였다.

2.7. 임상 성과

SOS는 MacDonald 등에 의한 진단 기준⁴⁸에 따라 alloHSCT 후 20 일 이내에 다음 중 두가지 이상의 증상 또는 징후를 가지는 것으로 정의하였다: total bilirubin ≥ 2 mg/dL, 통증을 동반한 간비대증, 체중 증가 $> 2\%$. 급성 GVHD는 alloHSCT 후 100 일 이내에 발생한 GVHD로 정의하고 1994 consensus criteria⁴⁹의 기준에 따라 II 등급 이상으로 분류되는 경우(erythematous rash가 있고 total bilirubin이 2 mg/dL 이상으로 상승하며 500 mL/day 이상의 설사 또는 지속적인 오심이 있는 경우)를 분석 대상으로 하였다. 만성 GVHD는 alloHSCT 시행 100 일 이후에 발생한 GVHD로 정의하고 Seattle criteria로 평가하였다.⁵⁰ 생착은 안정적인 키메라즘 또는 3 일 연속 500 mm^{-3} 이상의 절대 호중구 수(absolute neutrophil count, ANC)로, 거부반응은 기증자 세포의 부재로 정의하였다. TRM은 이식 후 100 일 이전의 모든 원인에 의한 사망으로 정의하였다.

2.8. 통계 분석

GST 효소의 유전적 다형성과 busulfan AUC의 관계는 t-test로 분석하였다. GST 효소의 유전형이 임상 성과에 미치는 영향, 그리고 HWE(Hardy-Weinberg equilibrium)과 유전형 분포의 차이는 Chi square test와 Fisher exact test로 분석하였다. busulfan AUC는 표적 AUC 범위인 950-1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ 와 비교하여 초과 군, 미달 군, 그리고 표적 범위 내의 정상 군으로 분류한 후, 군 간 임상 성과의 차이를 linear by linear association test로 분석하였다. 평가 지표는 SOS, II-IV 등급의 급성 GVHD, 만성 GVHD, 생착 실패 또는 거부 반응, TRM, 전체 생존률(overall survival, OS), 그리고 무질환 생존률(disease-free survival, DFS)로 하였다. OS 및 DFS는 Kaplan-Meier method로 추정하고 그 군 간 차이를 log-rank test로 비교하였다. 임상 성과 분석 시 환자의 성별, 질환 상태, 기증자 유형(혈연 vs. 비혈연), 기증자-수혜자 성별 불일치(여성 기증자) 등의 교란 요인을 보정하기 위한 다중회귀분석과 다변량 Cox 회귀분석을 시행하였다. 질환 상태는 앞서 기술한 EBMT/ELN의 기준을 적용하여 분류하였다.⁸ 모든 통계 분석은 SPSS version 21.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고 P value < 0.05일 때 유의하다고 간주하였다.

Chapter 3. Results

3.1. 환자 특성

총 36 명의 환자가 모집되었다. 모집된 환자의 인구학적 특성, 질환 및 이식 특성은 Table 4에 기술하였다. 모든 환자는 혈액 질환에 대하여 HLA 일치 공여자로부터 말초 혈액의 조혈모세포를 이식 받았다. 환자와 공여자의 HLA 10개 중 8개가 일치할 때에 HLA 일치 공여자로 간주하였다. 유전형의 분석 결과는 Table 5와 같았다. *GSTP1* 유전형은 환자 3 명에서, *GSTA1*, *GSTT1* 및 *GSTM1* 유전형은 각각 환자 2 명에서, 시료 부족 또는 분석 실패로 인하여 결측 처리되었다. *GSTA1*과 *GSTP1*의 유전형 빈도는 HWE에 따르는 것을 확인하였다. *GSTT1*과 *GSTM1* 결손의 경우, PCR 분석을 통한 이형접합 보유자(heterozygous carrier)와 동형접합 보유자(homozygous carrier)의 분리가 불가능하므로 HWE 성립 여부를 확인하지 않았다.

Table 4. Patient characteristics (n = 36)

Patient demographic characteristics	Median (range) or N (frequency, %)
Age (years)	41.5 (18 – 64)
Gender (male)	21 (58)
Height (cm)	167.8 (148.0 – 181.0)
Actual body weight (kg)	57.3 (46.4 – 81.0)
Body surface area (m ⁻²)	1.66 (1.40 – 1.95)
Serum creatinine (mg/dL)	0.78 (0.40 – 1.41)
Creatinine clearance (mL/min/1.73 m ²)	98.9 (51.6 – 180.4)
Serum albumin (g/dL)	4.0 (3.1 – 4.5)
Serum total bilirubin (mg/dL)	0.7 (0.4 – 2.1)
Serum ALP (U/L)	66 (40 – 160)
Serum AST (U/L)	21 (9 – 54)
Serum ALT (U/L)	22 (3 – 156)

Patient disease characteristics		
<i>Diagnosis</i>	<i>Disease stage, early / intermediate / late[†]</i>	<i>Total</i>
ALL	11 / 1 / 1	13 (36)
AML	4 / 2 / 2	8 (22)

MDS	2 / . / 2	4 (11)
NHL	1 / . / 4	5 (14)
CML	. / . / 2	2 (6)
Severe aplastic anemia	N/A	1 (3)
Myelofibrosis	N/A	3 (8)

Transplantation characteristics

Stem cell source (peripheral blood)	36 (100)
Donor type (matched sibling / matched unrelated) [‡]	17 (47) / 19 (53)
Conditioning regimen (busulfan + cyclophosphamide / busulfan + fludarabine)	15 (42) / 21 (58)
Graft vs host disease prophylaxis (cyclosporine + methotrexate / cyclosporine only)	27 (75) / 9 (25)
Fungal infection prophylaxis (azoles / micafungin)	28 (78) / 8 (22)

[†]Early disease stage includes ALL and AML in CR1, MDS either untreated or in CR1, CML in first chronic phase, and NHL either untreated or in CR1. Intermediate disease stage includes ALL and AML in CR2, CML in all other stages than chronic phase or blast crisis, MDS in CR2 or in PR, and NHL in CR2, in PR, or stable disease. Late stage disease includes ALL and AML in all other disease stages, CML in blast crisis, and MDS and lymphoma in all other disease stages than those defined as early or intermediate.

[‡]At least 8 of 10 match was considered to be a match.

Abbreviations: ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, ALL = acute lymphoid leukemia, AML = acute myeloid leukemia, MDS = myelodysplastic syndrome, NHL = non-Hodgkin lymphoma, CML = chronic myeloid leukemia, N/A = not applicable, CR1 = first complete remission, CR2 = second complete remission, PR = partial remission

Table 5. Glutathione-S-transferase (GST) gene frequency

Polymorphisms	Genotype	N (frequency, %)	P value [†]
<i>GSTAI</i> G-52A [‡]	GG	24 (71)	0.31
	GA	10 (29)	
	AA	–	
<i>GSTPI</i> A313G	AA	24 (73)	0.36
	AG	9 (27)	
	GG	–	
<i>GSTM1</i> deletion	Positive	20 (59)	N/A
	Null	14 (41)	
<i>GSTT1</i> deletion	Positive	23 (68)	N/A
	Null	11 (32)	

[†]P value from Hardy–Weinberg equilibrium test

[‡]*GSTAI* –52G and A defines haplotype *A and *B, respectively.

3.2. 약동학 분석

총 36 명의 환자에서 102 건의 busulfan 혈중 농도 자료를 수집하였다. 그 중 1 건은 최저정량한계인 20 ng/mL 미만의 농도로 분석에서 제외되어 총 101 건의 혈중 농도 자료를 분석하였다. 환자 1명 당 1-7 건의 혈중 농도 자료가 수집되었고 중간값은 3 건/명이었다.

수집된 혈중 농도 자료를 기반으로 1차 속도 소실의 1 구획 모형으로 개발한 집단약동학 기초 모델의 CL 추정치는 10.6 L/h, V 추정치는 41.7 L였다. 기초 모델에서 CL에 대한 각 공변량의 영향력을 스크리닝 하였고 그 결과는 Figure 7과 같았다. 스크리닝 결과에 따르면, CL는 *GSTA1* 유전형 및 체격을 반영하는 지표인 체중 및 체표면적과 유의한 상관성을 보였다. 체표면적보다 체중을 모델에 포함했을 때의 MOF 값이 조금 더 작았기 때문에 모델에는 체중을 포함하였다. 다른 공변량은 모델을 개선시키지 못하였다. 모델 개발 과정은 Table 6에 기술하였으며 최종 집단약동학 모델은 아래와 같았다.

$$CL = \theta_1 \times \left(\frac{BW}{60}\right)^{\theta_2} \times e^{\theta_3 GSTA1} \times e^{\eta_1}$$

BW = body weight

GSTA1 = 0 (wild-type) or 1 (mutant carrier)

최종 모델의 파라미터 추정치는 Table 7와 같다. 이에 따르면, 체중이 60 kg이며 *GSTA1* 유전 변이가 없는 전형적인 환자의 집단약동학 파라미터 추정치는 CL 11.0 L/h, V 42.4 L였다. CL 및 V의

IIV(변동 계수 %)는 각각 14.7%, 25.6%였다. CL는 *GSTA1* 유전형이 없는 환자에 비하여 있는 환자에서 15% 감소하였다(P value = 0.001, Figure 8A). 또한 환자의 체중이 10 kg 증가할 때 약 1.4배씩 증가하였다.

T-test 결과, busulfan의 AUC는 *GSTA1* wild-type 군에 비하여 변이 군에서 유의하게 높았다($1,031 \mu\text{M}\cdot\text{min}$ vs. $1,232 \mu\text{M}\cdot\text{min}$, P value = 0.001, Figure 8B). AUC 초과 환자 2 명 모두 *GSTA1* 변이를 가지고 있었다. 반면, AUC 미달 환자 9 명 중 *GSTA1* 유전형이 결측인 1 명을 제외하고는 모두 *GSTA1* wild-type의 환자였다.

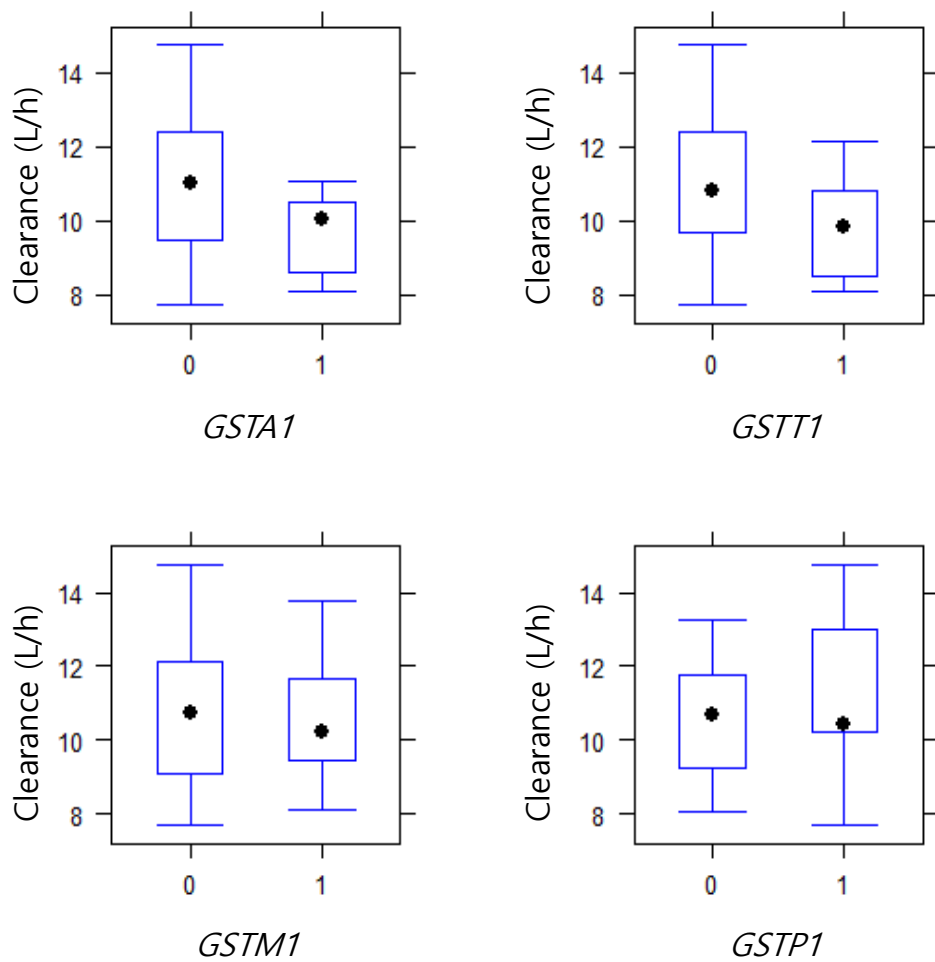


Figure 7. Screening of covariate effects on clearance

GSTA1, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* = 0 (wild-type) or 1 (mutant carrier)

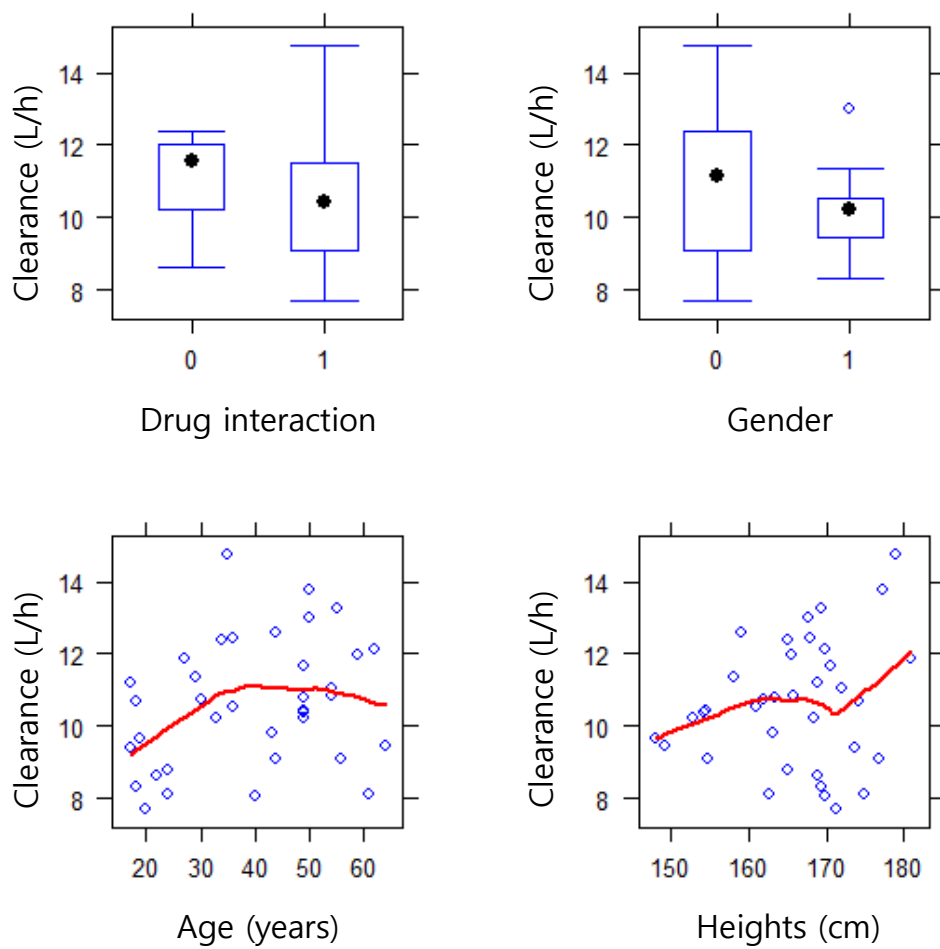


Figure 7. Screening of covariate effects on clearance (cont')

Drug interaction = 0 (no) or 1 (yes), gender = 0 (female) or 1 (male)

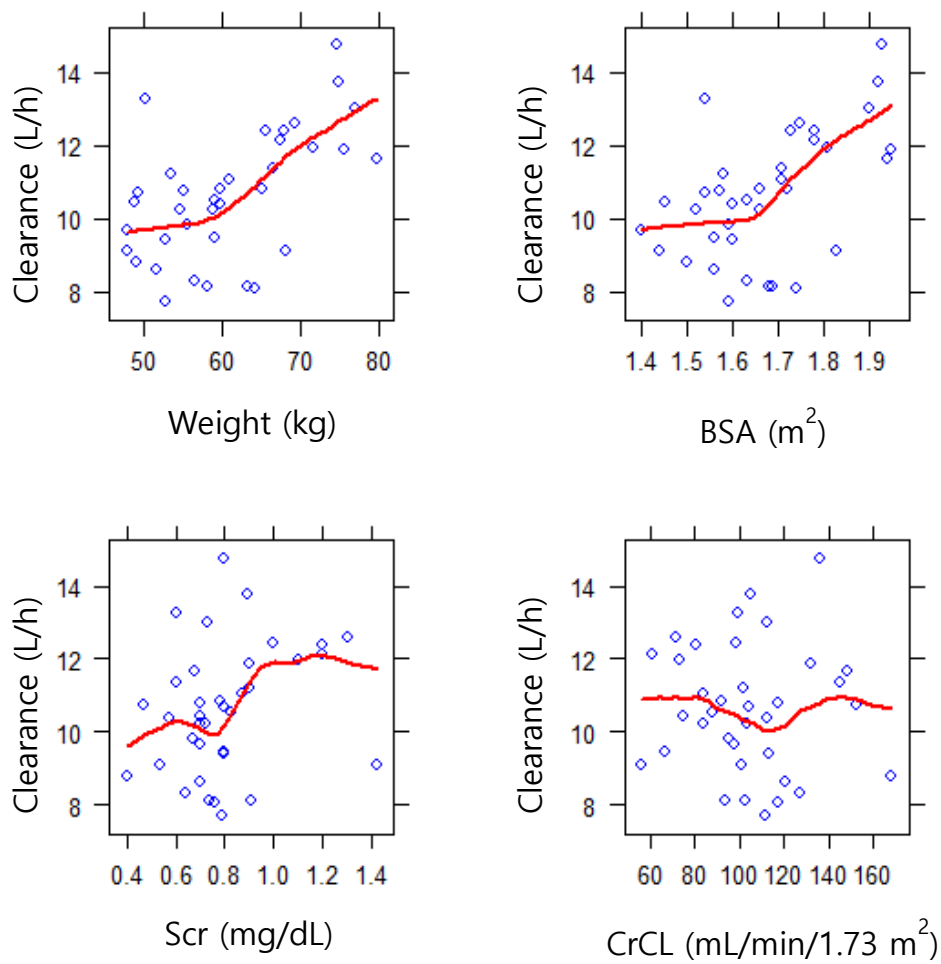


Figure 7. Screening of covariate effects on clearance (cont')

BSA = body surface area, Scr = serum creatinine, CrCL = creatinine clearance

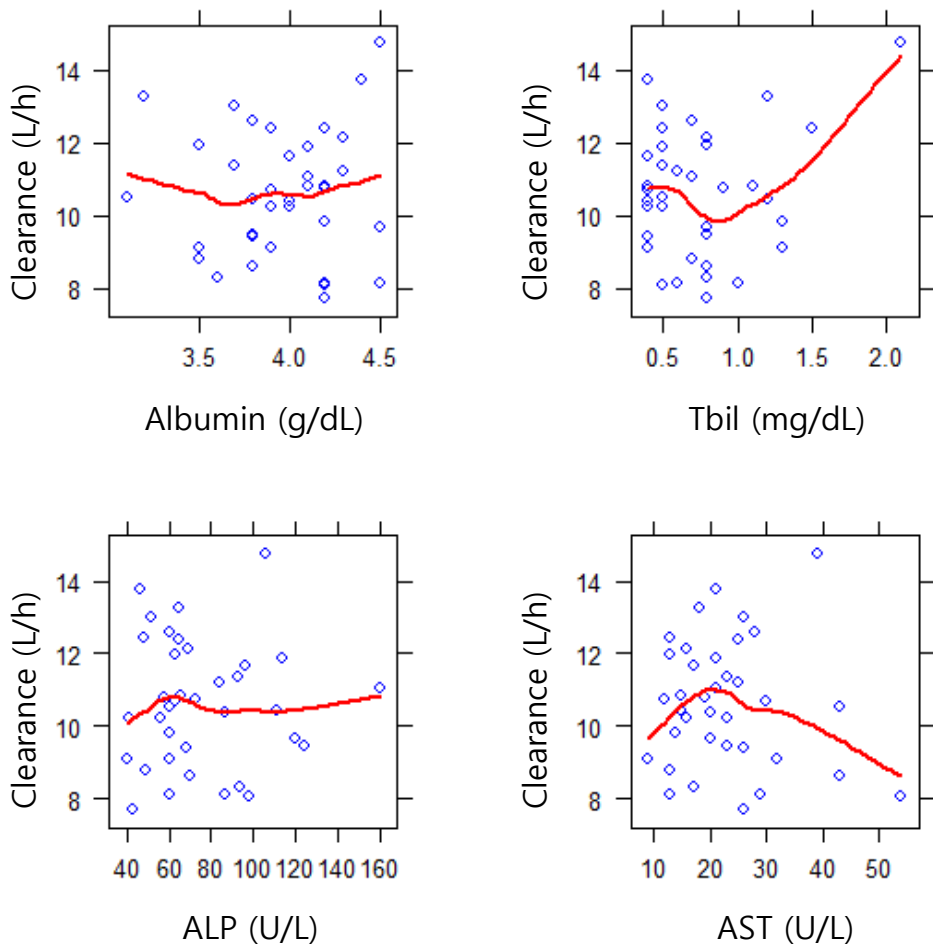


Figure 7. Screening of covariate effects on clearance (cont')

Tbil = total bilirubin, ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase

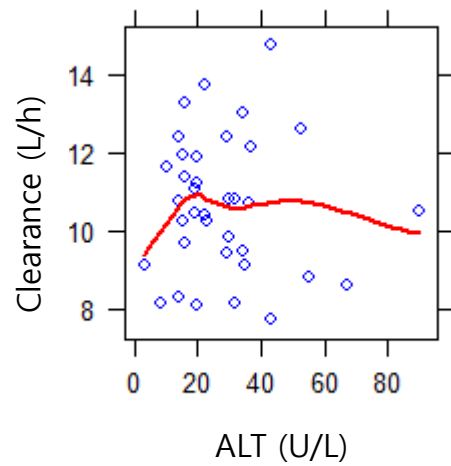


Figure 7. Screening of covariate effects on clearance (cont')

ALT = alanine aminotransferase

Table 6. Population pharmacokinetic model development process

Models	Covariates on CL	Changes in MOF from the base model	P value
Base model	—	—	—
Covariate model	Age	NS	
	Sex	NS	
	Height	NS	
	Serum creatinine	NS	
	CrCL	NS	
	Serum albumin	NS	
	Serum Tbil	NS	
	Serum ALP	NS	
	Serum AST	NS	
	Serum ALT	NS	
	<i>GSTP1</i>	NS	
	<i>GSTM1</i>	NS	
	<i>GSTT1</i>	NS	
	<i>GSTA1</i>	-4.504	< 0.05

	BSA	-10.172	< 0.005
	BW	-11.965	< 0.001
Final model	BW and <i>GSTA1</i>	-17.516	< 0.001

CL= clearance, MOF = minimum objective function value, NS = non-significant, BW = body weight, BSA = body surface area, CrCL = creatinine clearance, Tbil = total bilirubin, ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase

Table 7. Parameter estimates and 95% confidence intervals (CIs) derived by bootstrapping

Parameter (unit)	Final model	Bootstrap validation	
	Estimates (RSE%)	Lower 95% CI	Upper 95% CI
CL (L/h)	11.0 (4)	10.3	11.8
θ_2 BW	0.843 (26)	0.441	1.25
θ_3 <i>GSTA1</i>	− 0.161 (43)	− 0.281	− 0.041
V (L)	42.4 (6)	37.9	46.8
IIV _{CL} (%)	14.7 (39)	8.73	18.8
IIV _V (%)	25.6 (49)	11.0	34.5
RV (%)	15.3 (24)	11.6	18.3

RSE = relative standard error, CL = clearance, BW = body weight, V = volume of distribution, IIV = inter-individual variability, and RV = residual variability

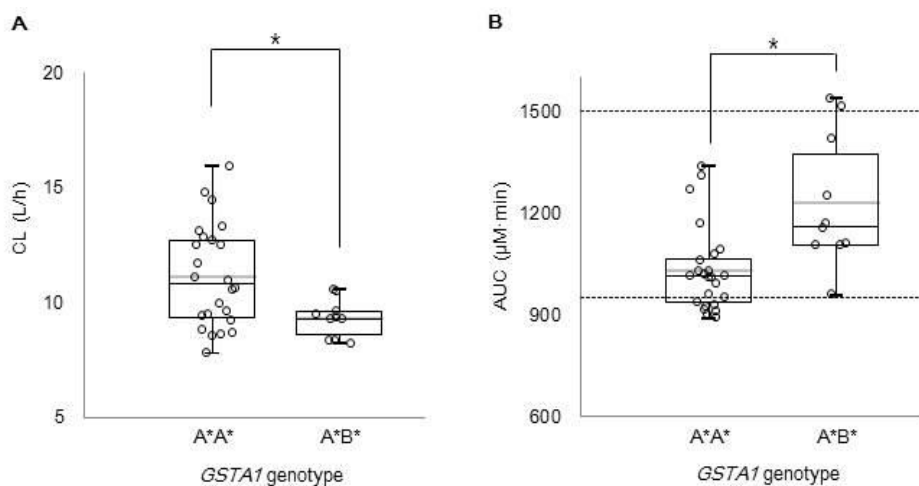
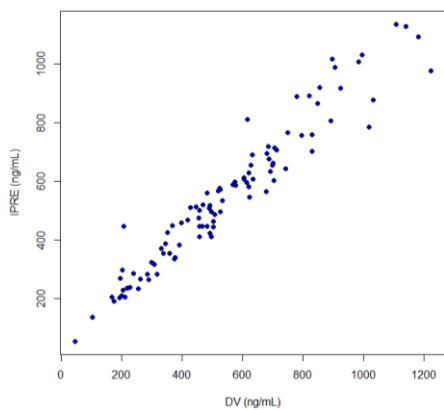


Figure 8. *GSTA1* effects on CL (A) and AUCs (B) (*P value < 0.05). The dashed black lines correspond to the upper and lower limit of the target AUCs.

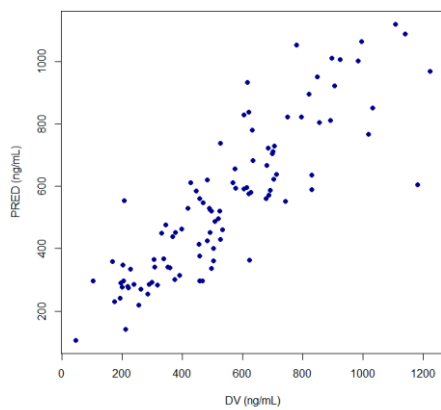
3.3. 모델 검증

Goodness-of-fit plot (Figure 9)에서 개인 간 다양성을 고려한 모델이 busulfan의 혈중 농도를 더욱 정확하게 설명하는 것으로 확인되었다(Figure 9A vs. 9B). CWRES(conditional weighted residual)은 혈중 농도 추정치나 시간에 따른 분포의 차이를 보이지 않고 0을 중심으로 고르게 분포하였다(Figure 9C 및 9D). Bootstrap 결과, original dataset의 모든 파라미터 추정치가 bootstrap을 통하여 산출된 95% 신뢰구간 내에 분포하였다(Table 7). VPC 시뮬레이션 결과, 관측치의 대부분이 95% 신뢰구간 내에 분포하였다(Figure 10). 상기 결과를 바탕으로 본 최종 모델이 내적으로 타당함을 확인하였다.

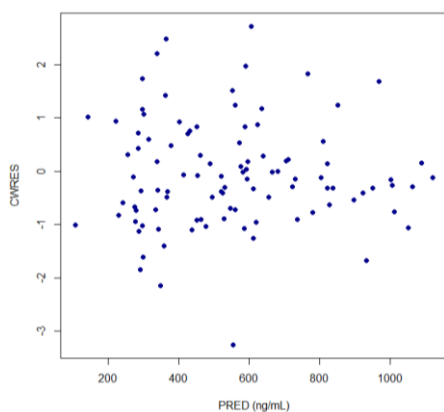
A



B



C



D

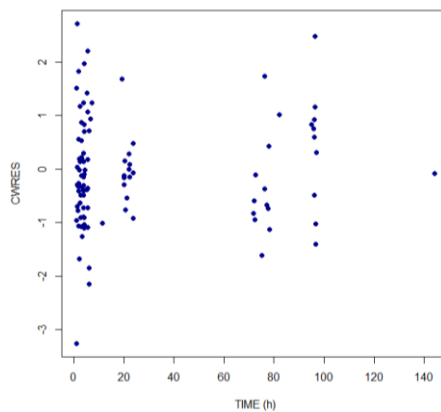


Figure 9. Goodness of fit plot of the final population pharmacokinetic model

(A) individual prediction (IPRED) vs. observed concentration (DV),
 (B) population prediction (PRED) vs. DV, (C) conditional weighted residual (CWRES) vs. PRED, (D) CWRES vs. TIME

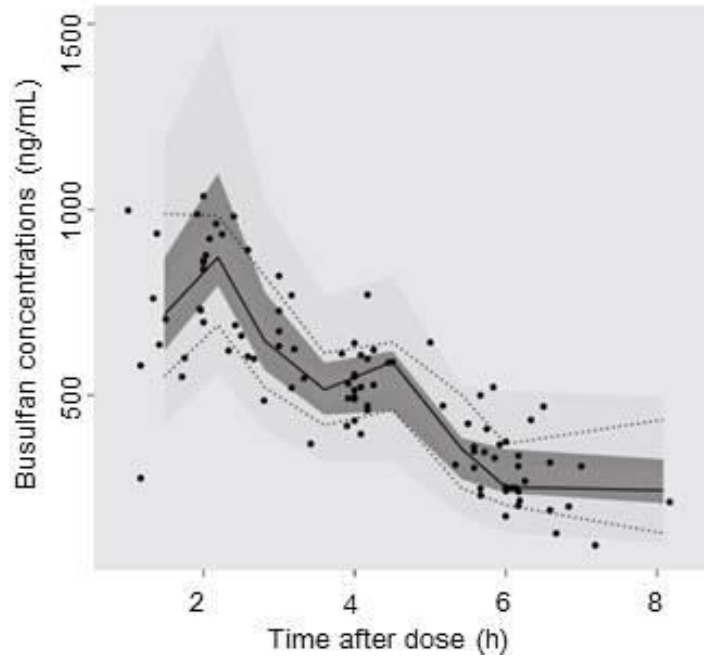


Figure 10. The visual predictive check (VPC, $n = 1,000$) plot for the busulfan pharmacokinetic model evaluation

3.4. 임상 성과

GSTA1 유전형에 따른 임상 성과의 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다. Busulfan의 AUC에 따른 임상 성과에 대한 단변량 분석에서, AUC가 표적에 비해 낮은 환자군에서는 급성 및 만성 GVHD와 TRM이 감소하고 생착 실패 또는 거부반응이 증가하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 생존률 분석 결과, OS의 중간값은 35.2 개월, 추적관찰기간의 중간값은 47.6 개월이었다. AUC가 표적 범위를 초과한 군에서 사망한 환자 1 명의 사인은 TRM이었으며 AUC가 표적보다 낮은 군에서 사망한 환자 5 명 중 3 명의 사인은 재발이었다(Table 8). OS에 대한 다변량 분석 결과 AUC가 표적 범위를 벗어난 환자의 사망 위험이 그렇지 않은 환자에 비하여 높은 경향을 보였으나(adjusted hazard ratio 3.642, P value = 0.061), 역시 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 본 연구 환자에서 SOS는 발생하지 않았다.

Table 8. Clinical outcomes according to busulfan exposures

Outcomes	AUCs, N (frequency, %)			<i>P</i> value
	< 950 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	950–1,500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	> 1,500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	
Acute GVHD	0/9 (0)	6/25 (24)	1/2 (50)	0.058
Chronic GVHD	1/8 (13)	7/21 (33)	1/1 (100)	0.097
Graft failure or rejection	3/9 (33)	3/24 (13)	0/1 (0)	0.150
Treatment related mortality	1/9 (11)	4/25 (16)	1/2 (50)	0.320
Outcomes	AUCs, N(frequency, %), survival time in months			<i>P</i> value
	950–1,500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	< 950 or > 1,500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$		
Overall survival	15/25 (60), 37.8		5/11 (46), 22.9	0.451
Disease-free survival	13/25 (52), 28.3		3/11 (27), 4.3	0.181

AUCs = area under the concentration versus time curve, GVHD = graft versus host disease

Chapter 4. Discussion

본 연구는 *GSTA1*의 유전적 다형성이 성인 환자에서 busulfan의 약동학에 관여함을 규명한 첫 번째 집단약동학 연구이다. 이전에 동 주제에 대하여 몇몇 연구가 수행되었으나 여러 한계점을 가지고 있다.

먼저, 소아를 대상으로 수행된 집단약동학 연구의 경우 그 결과가 서로 상이하였다. Gaziev 등⁴¹과 Johnson 등⁴²은 *GSTA1* 유전형과 busulfan CL 간에 유의한 상관관계가 있다고 보고하였으나 Zwaveling 등⁴³은 그렇지 않다고 보고하였다. 그러나 busulfan은 그 약동학적 특성이 소아와 성인에서 큰 차이를 보이기 때문에 위와 같은 소아 대상 연구에서 일관된 연구 결과가 도출되었더라도 이를 성인에 적용할 수는 없었을 것이다.⁴⁴

Busulfan의 약동학은 성인에서도 개인 간에 큰 차이를 보이며 그 주요 원인 중 하나가 *GSTA1*의 유전적 다형성임에도 불구하고 그간 성인 환자에서 *GSTA1*의 유전형과 busulfan의 약동학 간의 관계를 규명하기 위한 집단약동학 연구는 이루어진 바 없다. 이러한 상황에서 본 집단약동학 연구는 성인 환자에서 busulfan의 CL가 *GSTA1* 유전형에 의하여 유의한 차이를 보임을 규명하였다.

그간 성인 환자를 대상으로 동 주제에 대하여 수행된 conventional 약동학 연구 또한 그 결과가 서로 상이하였다. Ten Brink 등³¹과 Kim 등³²은 *GSTA1* *B 보유자에서 busulfan의 CL가 각각 14%, 12% 감소한다고 보고하였고 이는 본 연구에서 제시한 15%의 감소와 일관된 결과였다. Abbasi 등³³은 *GSTA1* 유전형이 busulfan의 CL에 유의한 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 그러나 해당 연구가 후향적으로

수행되었고 소아 환자가 일부 포함되었다는 측면에서, 그 결과에 교란요인이 상대적으로 크게 개입했을 가능성이 있다. 이러한 맥락에서, 본 집단약동학 연구는 *GSTA1* 유전변이가 busulfan의 CL를 감소시킨다는 근거를 추가적으로 확립하고 이에 대한 consensus 형성에 기여했다는 의미가 있다.

본 연구에서 분석한 여러 GST 동종효소 중 효소 활성이 가장 강한 것으로 알려진 *GSTA1*만이²⁶ 유일하게 그 유전형에 따라 busulfan CL의 유의한 차이를 유발하는 것으로 분석되었다. 또한 *GSTA1* *A haplotype (-631T, -567T, -69C, -52G)에 비하여 *GSTA1* 효소의 발현량을 감소시킨다고 알려져 있는 *GSTA1* *B haplotype(-631G, -567G, -69T, -52A)²⁵ 보유자에서 busulfan CL가 상대적으로 낮게 나타나, 기존에 제기된 *GSTA1*의 유전형과 표현형 간의 관계를 연구 대상 환자군에서 확인할 수 있었다.

GSTA1 유전형의 빈도는 *A*A: *A*B: *B*B 각각 71: 29: 0%로 분석되었으며 이는 기존에 보고된 동아시아인의 빈도와 유사하였다.^{32,51} 아시아인의 *GSTA1* 유전 변이율은 백인에 비해 낮은 것으로 알려져 있으며,⁴² 본 연구 결과의 해석 및 적용에 있어 이러한 인종차가 고려되어야 한다. 예를 들어, 동 집단약동학 모델은 백인 환자 개개인에게는 적용 가능하나 백인 환자 집단의 평균 약동학 파라미터 추정 시에는 인종에 따른 환자 집단 간의 유전형 분포의 차이가 고려되어야 한다.

상기 모든 집단약동학 연구와 본 연구에서 체격은 CL에 대한 공통 공변량이었다. 본 연구에서 체중과 체표면적의 고려 시 MOF 값이 유사한 정도로 감소하였다. 그러나 체중을 고려했을 때에 MOF 값이

약간 더 감소하였으며 busulfan의 용량이 일반적으로 체중에 따라 조절된다는 임상적 의미를 반영하여, 모델에는 체중을 포함하였다. 최종 모델에서 busulfan의 CL는 체중이 10 kg 증가할 때 약 1.4배씩 증가하였다.

Busulfan과 phenytoin, metronidazole, azole계 항진균제 등의 병용약물 간의 약물상호작용 또한 busulfan 약동학에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다. Metronidazole은 한 명의 환자만 사용하였다. Busulfan과의 상호작용이 보고된 기타의 약물을 사용한 환자는 없었다.

이에, 약물상호작용 중 azole계 항진균제($n = 28$)만을 분석하였고 그 결과 유의한 약물상호작용은 관찰되지 않았다. 기존의 azole계 항진균제와 busulfan 간 약물상호작용에 대한 연구에서 itraconazole의 사용은 busulfan CL를 유의하게 감소시켰으나 fluconazole의 사용은 그렇지 않았다는 보고가 있었다.²³ 본 연구 대상자는 fluconazole만을 사용하였다는 측면에서 본 연구 결과는 기존 연구 결과와 일관성을 보인다.

Fludarabine도 Yeh 등⁵²에 의하여 busulfan과의 약물상호작용이 보고된 바 있으나 대부분의 연구에서는 유의한 영향이 없다는 결론을 내렸다. Fludarabine과 같이 약물상호작용이 확립되지 않은 경우에는 본 연구에서 분석 대상으로 고려하지 않았다.

최종 집단약동학 모델에서, 체중이 60 kg이며 *GSTA1*의 유전형이 없는 전형적인 환자에서 약동학 파라미터의 평균 추정치는 CL 11.0 L/h, V 42.4L였다. 이는 기존 연구에서 보고된 CL 11.2 L/h, V 44.3L와 유사하였다.⁵³ CL의 IIV는 14.7%, V의 IIV는 25.6%, 잔차 변동은 15.3%로 수용 가능한 정도의 수치를 나타내었다. Goodness-

of-fit plot, bootstrap과 VPC 결과 또한 본 연구를 통하여 개발된 모델의 적합성을 시사하였다.

본 연구에서 *GSTA1* 유전 변이는 busulfan의 CL 뿐 아니라 AUC에도 유의한 영향을 미쳤다. 연구 대상 환자 중 표적 AUC에 미달된 자가 상대적으로 많았던 것은 아시아인에서 *GSTA1*의 변이 빈도가 높은 것에 기인할 가능성이 있다. 해당 환자에서는 표적 AUC인 $1,125 \mu\text{M}\cdot\text{min}$ 에 도달하기 위하여 기존 용량인 0.8 mg/kg 보다 많은 1.0 mg/kg 의 용량이 필요한 것으로 계산되었다. 따라서 표적 AUC에 미달될 것으로 예상되는 환자군에서는 상기와 같은 증량을 고려할 수 있겠다.

Busulfan의 노출량과 임상 성과 간의 관계를 분석한 결과, 급성 GVHD는 AUC 초과 군에서 증가하는 경향을 보였으며 OS는 표적 AUC를 벗어난 환자 군에서 감소하는 경향을 보였다. Kim 등⁵⁴에 의해 보고되었던 *GSTA1* 유전형과 임상 성과 간의 직접적인 관련성은 본 연구에서는 관찰되지 않았다. 본 임상 성과 분석 결과를 해석함에 있어 연구 대상자에 다른 종류의 전처치 요법을 받은 환자들이 포함되었음에 대한 주의가 필요하다.

본 연구에는 다음과 같은 몇가지 제약이 있다.

첫째, 연구대상 환자 수가 상대적으로 적다($n = 36$). 그러나 집단약동학 분석법의 활용 시, 매우 적은 수의 환자로부터도 약동학 지표의 정확한 추정이 가능하며⁵⁵ 본 연구의 환자 수는 유사 집단약동학 연구에 비하여 적지 않았다.^{42,56} 또한 Environmentally determined genetic expression concept⁵⁷에 따라 유전적 다형성이 임상적으로 의미 있는 효과를 나타내기 위하여 넘어야 하는 역치 값이 유전·환경의 복합

요인에 의해 결정된다 가정할 때, 본 연구 대상 환자가 처한 고용량 항암요법, alloH SCT와 같은 극심한 스트레스 상황에서는 유전적 요소가 상대적으로 약하더라도 유전적 다형성의 결과가 강력하게 나타날 수 있다(Figure 11). 즉, 상대적으로 적은 수의 환자에서도 그 결과를 관찰할 수 있게 된다. 이러한 이유로 본 연구대상 환자 수는 일반적인 방법으로 산출한 것에 비하여 적었으나, *GSTA1*의 유전적 다형성이 busulfan의 약동학 지표에 미치는 유의한 영향력을 확인할 수 있었다.

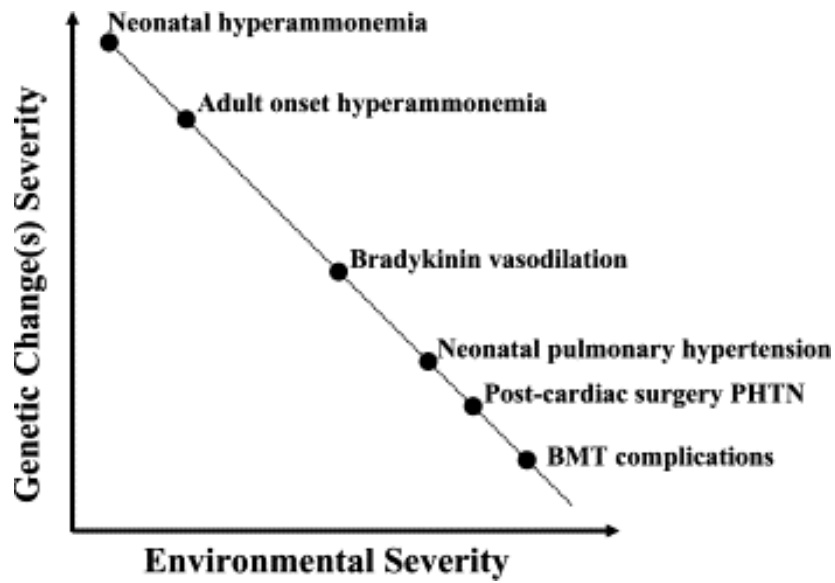


Figure 11. Environmentally determined genetic expression concept
Adapted from Summar ML et al. *Molecular Genetics and Metabolism*.
(2004)

둘째, 혈액 채취가 limited sampling strategy에 따라 수행되었다. 그러나 본 연구에서 사용한 limited sampling strategy는 기존 연구에서 busulfan의 AUC와 CL의 정확한 추정 능력을 증명 받았고 실제로 busulfan의 허가사항에 반영되어 임상적으로 활용되어 온 방법이었다.^{10,11,58} 임상 현장에서 시간과 비용 측면에서 선호되지 않는 dense sampling을 본 연구를 위하여 환자들에게 적용하는 것은 바람직하지 않다고 판단하였다. 이에 연속적인 시간에 따른 혈중 농도의 프로파일을 추정하는 과정에서 발생할 수 있는 오차 중의 일부는 4명의 환자에서 수행한 rich sampling 결과와 집단약동학 모델 내의 IIV 및 잔차 변동 모델을 통하여 일부나마 극복하고자 하였다. 임상 현장에서 치료 중에 있는 환자를 대상으로 sampling을 하다 보니 여러 이유에 의하여 계획한 sampling 중 일부가 누락된 환자도 있었다. 환자 1명당 수집된 혈중 농도 자료 수의 중간값은 3건으로 1차 속도 소실의 1구획 모델로 잘 설명되는 busulfan의 약동학을 모델링 하기에 크게 부족함이 없었으나 환자 간 sampling 횟수가 동일한 경우에 비교한다면 추가적인 변동을 유발하였을 가능성이 있다. 그러나 위에서 기술한 바와 같이 본 모델의 변동은 모두 수용 가능한 수준이었으며 모델의 타당도 검증 결과 또한 본 모델을 신뢰할 수 있음을 시사하였다.

본 연구는 성인 환자에서 busulfan의 약동학에 대한 *GSTA1* 유전형의 영향을 분석한 첫 집단약동학 연구라는 데에 그 의의가 있다. 또한 약물 상호작용 등의 다양한 임상적 요인을 고려하였고 alloHSCT의 임상 성과를 함께 분석했다는 장점을 가진다.

본 연구를 통하여 도출된 집단약동학 모델은 체중과 *GSTA1* 유전형의 조합에 따라 busulfan의 개인별 CL를 예측하는 데에 활용할

수 있을 것이다. CL 추정치에 표적 AUC 값인 $1,125 \mu\text{M}\cdot\text{min}$ 를 곱하면 busulfan의 개인별 용량 또한 산출이 가능하다. 이러한 모델 기반 CL 및 개인별 용량을 임상 현장에서 활용하기 위하여 Table 9과 같은 nomogram을 제시할 수 있겠으나, 임상적 활용 이전에 외적 타당도의 검증(external validation)이 선행되어야 할 것이다. 또한 동 집단약동학 모델의 임상적 활용 방안은 이미 busulfan의 임상 성과 개선 효과가 입증되어 있는 TDM의 활용 방안과 함께 고려되어야 한다. IV busulfan의 TDM은 앞서 기술한 바와 같이 최근 연구를 통하여 그 필요성이 재차 확인된 바 있으나, 일단 1 회 이상 투약이 이루어진 후 검사를 수행할 수 있고 그 결과를 확인하고 적용하는 데에 시간이 소요된다는 단점이 있다. 모델 기반 개인별 용량은 TDM을 시행하기 이전에 최적 용량을 더욱 정확하게 산출하는 데에 도움을 줄 수 있다. 단, 그것이 TDM을 대체할 수 있는지 또는 TDM과 함께 사용되었을 때에 임상 성과 및 경제성 측면의 이득을 가져다 줄 수 있을지의 여부는 추가적인 연구를 통한 확인이 필요할 것이다.

향후 동 주제에 대하여 새로운 환자군에서의 외적 타당도 검증과 최적 용량 개발, 그리고 임상 성과에 대한 *GSTA1* 유전형의 영향을 확인하기 위한 전향적인 연구가 추가로 진행된다면 본 연구 결과의 임상적 효용을 더욱 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Table 9. An example of nomogram for estimating clearance (L/h) of busulfan

<i>GSTA1</i> effect BW effect		Genotype	Wild– type	Mutant carrier
		Effects on CL	× 1.0	× 0.85
BW (kg)	Effects on CL			
40	× 0.71		7.82	6.64
50	× 0.86		9.43	8.02
60	× 1.00		11.00	9.35
70	× 1.14		12.53	10.65
80	× 1.27		14.02	11.92

* Model based individualized dose of busulfan = CL × target AUC
(1,125 μM·min)

Abbreviations: CL= clearance, AUC = area under the concentration–
time curve

Chapter 5. Conclusion

본 연구는 *GSTA1*의 유전적 다형성이 성인 환자에서 busulfan의 약동학에 관여함을 규명한 첫 번째 집단약동학 연구로, *GSTA1*의 유전 변이가 있을 때에 busulfan의 CL가 15% 감소하며 AUC는 증가함을 확인하였다(모두 P value < 0.05). *GSTA1*의 유전형은 변수로 포함한 동 집단약동학 모델은 성인 alloHSCT 환자에서 임상 성과를 개선하기 위한 busulfan 노출량의 예측 및 조절에 활용할 수 있겠다.

References

1. Hoffman R, Benz Jr EJ, Silberstein LE, Heslop H, Anastasi J, Weitz J. *Hematology: basic principles and practice*. Elsevier Health Sciences; 2013.
2. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1975;292(17):895-902.
3. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. Paper presented at: *Seminars in hematology*. 2006.
4. Andersson BS, Thall PF, Madden T, et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: Defining a therapeutic window for IV BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):477-485.
5. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17(2):225-230.
6. Kollman C, Spellman SR, Zhang M-J, et al. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor

- transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2015;blood-2015-2008-663823.
7. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1487-1496.
 8. Gratwohl A, Stern M, Brand R, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*. 2009;115(20):4715-4726.
 9. Krivoy N, Hoffer E, Lurie Y, Bentur Y, Rowe JM. Busulfan use in hematopoietic stem cell transplantation: pharmacology, dose adjustment, safety and efficacy in adults and children. *Current drug safety*. 2008;3(1):60-66.
 10. Micromedex T. Micromedex® Healthcare Series. *USA: Thomson Micromedex, (1974-2006)*. 2002.
 11. Hassan M, Fasth A, Gerritsen B, et al. Busulphan kinetics and limited sampling model in children with leukemia and inherited disorders. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18(5):843-850.
 12. Tesfaye H, Branova R, Klapkova E, et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral

- busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant.* 2014;19:214–224.
13. Buggia I, Locatelli F, Regazzi MB, Zecca M. Busulfan. *Ann Pharmacother.* 1994;28(9):1055–1062.
 14. Gibbs JP, Gooley T, Corneau B, et al. The impact of obesity and disease on busulfan oral clearance in adults. *Blood.* 1999;93(12):4436–4440.
 15. Uppugunduri CRS, Rezgui MA, Diaz PH, et al. The association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with sulfolane formation and the efficacy of a busulfan–based conditioning regimen in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *The pharmacogenomics journal.* 2014;14(3):263.
 16. Alyea EP, Kim HT, Ho V, et al. Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood.* 2005;105(4):1810–1814.
 17. Copelan EA, Biggs JC, Thompson JM, et al. Treatment for acute myelocytic–leukemia with allogeneic bone–marrow transplantation following preparation with BUCY2. *Blood.* 1991;78(3):838–843.

18. Nguyen L, Leger F, Lennon S, Puozzo C. Intravenous busulfan in adults prior to haematopoietic stem cell transplantation: a population pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;57(2):191–198.
19. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan – Does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet.* 2000;39(2):155–165.
20. Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, et al. Therapeutic drug monitoring–guided dosing of busulfan differs from weight–based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy.* 2017;10(2):70–78.
21. Vassal G, Deroussent A, Challine D, et al. Is 600 mg/m² the appropriate dosage of busulfan in children undergoing bone–marrow transplantation. *Blood.* 1992;79(9):2475–2479.
22. Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, et al. Pharmacokinetics of high–dose busulfan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;28(2):130–134.
23. Buggia I, Zecca M, Alessandrino EP, et al. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients

- given bone marrow transplantation. *Anticancer Res.* 1996;16(4A):2083–2088.
24. Hassan M, Oberg G, Bjorkholm M, Wallin I, Lindgren M. Influence of prophylactic anticonvulsant therapy on high-dose busulfan kinetics. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;33(3):181–186.
25. Coles BF, Morel F, Rauch C, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenet Genom.* 2001;11(8):663–669.
26. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metabo and Dispos.* 1996;24(9):1015–1019.
27. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445–520.
28. Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, et al. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Protocol for the Simultaneous Analysis of the Glutathione-Transferase GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms. *Anal Biochem.*

- 1996;236(1):184–186.
29. Ali–Osman F, Akande O, Antoun G, Mao J–X, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full–length cDNAs of three human glutathione S–transferase Pi gene variants Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(15):10004–10012.
 30. Kelada SN, Stapleton PL, Farin FM, et al. Glutathione S–transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2003;337(1):5–8.
 31. ten Brink MH, Wessels JA, den Hartigh J, et al. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(2):190–195.
 32. Kim S–D, Lee J–H, Hur E–H, et al. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(8):1222–1230.
 33. Abbasi N, Vadnais B, Knutson JA, et al. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in

- hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol*. 2011;51(10):1429–1438.
34. Rocha V, Porcher R, Fernandes J, et al. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia*. 2009;23(3):545–556.
35. Goekkurt E, Stoeblmacher J, Stueber C, et al. Pharmacogenetic analysis of liver toxicity after busulfan/cyclophosphamide-based allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Anticancer Res*. 2007;27(6C):4377–4380.
36. Bonate PL, Steimer J-L. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation*. Springer; 2006.
37. Wagner JG. History of pharmacokinetics. *Pharmacol Ther*. 1981;12(3):537–562.
38. Peck CC, Barr WH, Benet LZ, et al. Opportunities for integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. *J Clin Pharmacol*. 1994;34(2):111–119.

39. Huang X, Li J. Pharmacometrics: The science of quantitative pharmacology. *Am J Pharm Educ.* 2007;71(4).
40. Beal SL, Sheiner LB. *NONMEM User's Guides*. Hanover, Md: ICON; 1998.
41. Gaziev J, Nguyen L, Puozzo C, et al. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood.* 2010;115(22):4597–4604.
42. Johnson LA, Orchard PJ, Baker KS, et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce Busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol.* 2008;48(9):1052–1062.
43. Zwaveling J, Press RR, Bredius RGM, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit.* 2008;30(4):504–510.

44. Grochow LB. Busulfan disposition – the role of therapeutic monitoring in bone–marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol.* 1993;20(4):18–25.
45. Chen L, Zhou Z, Shen M, Ma A. Quantitative analysis of busulfan in human plasma by LC–MS–MS. *Chromatographia.* 2009;70(11–12):1727–1732.
46. Chen C–L, Liu Q, Pui C–H, et al. Higher frequency of glutathione S–transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1997;89(5):1701–1707.
47. Parke J, Holford NHG, Charles BG. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed–effects population models. *Comput Methods Programs Biomed.* 1999;59(1):19–29.
48. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, et al. Veno–occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 1993;118(4):255–267.
49. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15(6):825–828.
50. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic

- graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *The American journal of medicine*. 1980;69(2):204–217.
51. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1–2):93–98.
 52. Yeh RF, Pawlikowski MA, Blough DK, et al. Accurate Targeting of Daily Intravenous Busulfan with 8-Hour Blood Sampling in Hospitalized Adult Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(2):265–272.
 53. Sandstrom M, Karlsson MO, Ljungman P, et al. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(7):657–664.
 54. Kim I, Keam B, Lee K-H, et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant*. 2007;21(2):207–213.

55. Mahmood I, Duan J. Population pharmacokinetics with a very small sample size. *Drug Metabol Drug Interact.* 2009;24(2-4):259-274.
56. Kim I-W, Yun H-y, Choi B, et al. Population pharmacokinetics analysis of cyclophosphamide with genetic effects in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(8):1543-1551.
57. Summar ML, Hall L, Christman B, et al. Environmentally determined genetic expression: clinical correlates with molecular variants of carbamyl phosphate synthetase I. *Mol Genet Metab.* 2004;81:12-19.
58. Vaughan WP, Carey D, Perry S, Westfall AO, Salzman DE. A limited sampling strategy for pharmacokinetic directed therapy with intravenous busulfan. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(11):619-624.

Abstract

A population pharmacokinetic
analysis of busulfan with *GSTA1*
polymorphisms in patients
undergoing allogeneic
hematopoietic stem cell
transplantation

Boyoon Choi

College of Pharmacy, Clinical Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Busulfan is widely used as part of a conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) in the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. Busulfan has a very narrow therapeutic window and its systemic exposure over the course of treatment is associated with a higher risk of side effects or treatment failure. However, control of a patient's exposure of busulfan is limited by large inter-individual variability (IIV) and intra-individual variability in busulfan pharmacokinetics (PK).

This high PK variability could in part be explained by polymorphisms in genes coding glutathione S-transferase (GST) which primarily metabolizes busulfan. Several studies have been conducted on whether the genetic polymorphisms influence busulfan PK and treatment outcomes, the results remain controversial. In addition, many other factors such as body weight (BW), age, disease status, hepatic function, drug interactions (azoles and phenytoin) and circadian rhythmicity have been documented to affect the busulfan PK but this needs to be further evaluated.

Determination of population pharmacokinetics (PPK) using nonlinear mixed-effects modeling (NONMEM®) software is very useful for comprehensive analysis on the impact of various covariates on PK variability so that PK can be mathematically and predictably described. Moreover, PPK analysis enables powerful detection of covariates even from small samples and sparse data through

assessment of IIV and residual variability.

This analysis was aimed at developing a PPK model by investigating and quantifying the relationships of covariates including GST polymorphisms of intravenous busulfan in adult patients undergoing alloHSCT. The influence of GST genotypes and busulfan PK on clinical outcomes was investigated as well.

Adult patients undergoing alloHSCT with busulfan conditioning at Seoul National University Hospital were enrolled from 2009 to 2011. Intravenous busulfan 0.8 mg/kg was infused over 2 h. Blood samples for busulfan determination and genotyping were withdrawn from central venous lines at preinfusion, 2, 4, and 6 h after beginning the first infusion and at 6 h after starting the last infusion. Dense sampling at 1, 2, 2.5, 3, 4, and 6 h after the start of the first infusion was performed in four patients who gave additional consents. Busulfan plasma concentrations were determined using an HPLC/MS/MS method. DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes. *GSTA1* G-52A (which defines haplotype *A/*B), *GSTP1* A313G, and *GSTM1* and *GSTT1* deletion were determined by direct sequencing, SNaPshot, and polymerase chain reaction (PCR), respectively.

PPK modeling was conducted using NONMEM[®] (version 7.2). The base PPK model was a one-compartment open model with first-order elimination as previously described. Residual and IIV was described by a combined additive-proportional model and an

exponential model, respectively. The influence of the following covariates on clearance (CL) was then investigated by stepwise procedure: gender, BW, body surface area (BSA), total bilirubin, serum aspartate transaminase (AST), serum alanine transaminase (ALT), drug interaction and presence of mutant alleles of the *GSTA1*, *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* genes. A reduction in the minimum objective function (MOF) of > 3.84 (which indicates a change that is significant; P value < 0.05) was used to evaluate the influence of each covariate. The first-order conditional estimation (FOCE) method was used throughout the analysis. The model was validated using a bootstrap and a visual predictive check (VPC) procedure.

The relationships between GST genetic polymorphisms and busulfan AUCs were characterized by t -test. The influence of GST genotype or busulfan AUCs on clinical outcomes was analyzed by χ^2 test, Fisher exact test, and linear by linear association as appropriate. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were estimated by a Kaplan-Meier method and compared by log-rank test. Multiple regression and multivariable Cox regression analyses were performed to adjust for confounding factors in outcome analyses. All statistical analyses were performed with SPSS version 21.0 and P values of < 0.05 were considered significant.

A total of 101 busulfan concentrations from 36 patients were available for analyses. All enrolled patients received alloHSCT from a human leukocyte antigen (HLA) matched donors using peripheral

blood stem cells for their hematologic diseases. Genotype frequencies of *GSTA1* and *GSTP1* were in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). A PPK model was developed and the model evaluation results demonstrated the stability of the final model and confirmed the reliability of the parameter estimates. The basic model parameter estimates were CL 10.6 L/h and volume of distribution (V) 41.7 L. CL was found to significantly correlate with *GSTA1* genotype and BW. Population estimates for a typical patient weighing 60 kg with wild-type *GSTA1* were CL 11.0 L/h and V 42.4 L. The IIV values for CL and V were 14.7% and 25.6%, respectively.

Busulfan CL was estimated to be increased by 1.4 times for each 10 kg increase in BW. Patients with a *GSTA1* mutant allele were predicted to have 15% lower busulfan CL compared with those with wild-type *GSTA1* (P value = 0.001). T-test results showed that busulfan AUCs were significantly higher in the *GSTA1* mutant group when compared with the wild-type group (1,232 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ vs 1,031 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$; P value = 0.001). Two patients with supra-therapeutic AUC levels had *GSTA1* mutant alleles. Otherwise, all patients with sub-therapeutic AUCs (n = 9) had wild-type *GSTA1* except one patient with missing data.

Acute graft versus host disease (GVHD), chronic GVHD and treatment related mortality (TRM) tended to be increased in the upper AUC group while graft failure or rejection tended to be increased in the lower AUC groups. Median OS was 35.2 months with

a median follow-up of 47.6 months. OS after adjusting prognostic factors had a tendency to be decreased in patients with supra-therapeutic or sub-therapeutic AUCs than those with therapeutic AUCs (adjusted hazard ratio 3.642, P value = 0.061). However, analyses on clinical outcomes did not show any significant difference between *GSTA1* genotypes or AUC groups. Sinusoidal obstructive disease (SOS) was not observed in any patients.

The present study has suggested for the first time that *GSTA1* polymorphisms in adults are associated with busulfan PK using a PPK approach. Study results confirmed that busulfan CL was decreased by 15% and AUCs was increased with *GSTA1* variants compared with wild-type. Current PPK model with *GSTA1* genotyping may help predict and control busulfan exposure and improve clinical outcomes in adult patients undergoing alloHSCT.

Keywords : busulfan, glutathione S-transferase A1 (*GSTA1*), genetic polymorphisms, population pharmacokinetics, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT)

Student Number : 2008-21815

Acknowledgement

본 학위 논문의 내용은 *Pharmacogenomics* 2015;16(14):1585-1594에 게재되었다.